



Unione Europea

Fondo Sociale Europeo



Ministero dell'Istruzione,
dell'Università e della Ricerca



Università degli studi
di Palermo

Dipartimento dei Sistemi Agro-Ambientali

Dottorato di Ricerca

Tecnologie per la sostenibilità e il risanamento ambientale

XXII Ciclo

Settore disciplinare Bio18

**Genotossicità in cellule procariotiche ed eucariotiche dei terpeni
presenti nei reflui della industria agrumaria e loro degradazione
per mezzo di fotocatalisi eterogenea**

Tutor

Prof.ssa Giulia Sciandrello

Tesi di Dottorato di:

Marghereth Saverini

Co-Tutor

Prof. Leonardo Palmisano

Coordinatore

Prof. Giuseppe Alonzo

Anno accademico 2007/2008

INDICE

<u>PREFAZIONE</u>	<u>4</u>
L'AMBIENTE E L'UOMO: SOSTENIBILITÀ E RISANAMENTO	4
<u>INTRODUZIONE</u>	<u>10</u>
MONITORAGGIO AMBIENTALE	11
INDICATORI CHIMICI	14
SPME	14
GAS CROMATOGRAFIA	17
INDICATORI BIOLOGICI	19
MUTAGENESI AMBIENTALE	21
TEST DI AMES	23
IL TEST DEL LOCUS HGPRT	28
COMET ASSAY	29
OBIETTIVI DELLA RICERCA	32
INDUSTRIA DI TRASFORMAZIONE AGRUMARIA	35
RESIDUI DI LAVORAZIONE E TRATTAMENTO DELLE ACQUE REFLUE	38
NORMATIVA DI RIFERIMENTO	40
TERPENI	44
L'ALFA E IL BETA PINENE	52
IL D- LIMONENE	52
IL DELTA 3-CARENE	53
FOTOCATALISI ETEROGENEA	54
<u>MATERIALI E METODI</u>	<u>67</u>
CAMPIONAMENTI	68
SPME	68
TEST DI AMES	72
LINEA CELLULARE E REAGENTI CHIMICI	76
SAGGIO DI ESCLUSIONE DEL TRYPAN BLUE	77
SAGGIO CLONOGENICO	78
COMET ASSAY	79
TEST PER LA SELEZIONE DEI MUTANTI 6TG RESISTENTI	81
ANALISI STATISTICA	83
FOTOCATALISI	84
T.O.C: ANALIZZATORE DI CARBONIO ORGANICO TOTALE	86

RISULTATI E DISCUSSIONE	88
TIPOLOGIE E CONCENTRAZIONE DEI TERPENI RISCONTRATI NEI REFLUI MEDIANTE SPME	89
VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ MUTAGENA DEI TERPENI E DEI REFLUI IN SALMONELLA TYPHIMURIUM	105
VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI TOSSICI E GENOTOSSICI DEI REFLUI IN CELLULE V79 DI HAMSTER CHINESE	109
SAGGIO CLONOGENICO	109
TEST DI MUTAZIONI AL LOCUS HGPRT	113
VALUTAZIONE DELLA GENOTOSSICITÀ DEI TERPENI MEDIANTE	116
IL COMET ASSAY	116
MINERALIZZAZIONE DEI TERPENI E DEI REFLUI REALI TRAMITE FOTOCATALISI ETEROGENEA	122
VALUTAZIONE DELLA GENOTOSSICITÀ DEI REFLUI REALI	128
TEST DI AMES	128
COMET ASSAY	129
CONCLUSIONI	135
BIBLIOGRAFIA	137
ATTIVITÀ SVOLTA DURANTE IL PERIODO DI DOTTORATO	145

Prefazione

L'ambiente e l'uomo: sostenibilità e risanamento

“La Terra è il pianeta su cui vive l'umanità, il terzo in ordine di distanza dal Sole. È il più grande dei pianeti terrestri del sistema solare, sia per quanto riguarda la massa sia per il diametro, ed è l'unico corpo planetario del sistema solare adatto a sostenere la vita, almeno tra quelli conosciuti alla scienza moderna”. Questa è la definizione di terra che si può leggere in qualsiasi testo scientifico e non, e sui vari motori di ricerca mediatici. In chiave più moderna è stata definita anche *“un'astronave vagante nello spazio col suo carico di specie vitali”* (Focus n. 205 ottobre 2009). Sia nella sua definizione classica che fantascientifica, è possibile leggere una realtà di fondo da cui ciascuno di noi non potrebbe e dovrebbe trascendere nella sua quotidianità: questa Terra è tutto il nostro mondo, e a meno di non scoprire per avventura altri pianeti simili al nostro, non abbiamo nulla al di fuori di Lei. La coesistenza con e dentro questa casa è dunque imperativa. L'impegno è tanto più grave se consideriamo che l'uomo è la specie “dominante” di questo pianeta e che dal proprio comportamento dipende anche il destino delle altre specie: *“...il vivente ha nell'anima un principio essenziale e costante di organizzazione che lo colloca in una scala gerarchica di perfezioni culminanti nell'uomo...”* (Aristotele). Tuttavia, il modello di vita individuale e quello collettivo speculativo si rivelano troppo spesso inversamente proporzionali rispetto ai dettami teorici di una ponderata e seria logica di rispetto ambientale e i buoni propositi che i grandi della politica internazionale hanno dato a vedere, firmando accordi e sottoscrivendo protocolli, non sembrano essere poi tanto prioritari. Per ipotizzare le condizioni di una possibile simbiosi uomo-ambiente si deve partire da una domanda: si può

pensare e praticare un progetto non illogico, applicabile e non aporetico, che consenta di avere vantaggi per l'uomo e contemporaneamente per l'ambiente? Per dare una risposta a questa domanda esemplifichiamo il concetto in un problema matematico. Data un'equazione A in un sistema B, con semplici sostituzioni si giunge a dimostrare C. Se A è l'uomo e B l'ambiente, la soluzione C, che per definizione esplicita l'insieme di tutte le soluzioni dell'equazione, dovrebbe essere la simbiosi tra le due parti. Ma basta guardarsi intorno per capire che il risultato della "equazione reale" non è questa. Bisogna aggiungere altre variabili per trovare la conseguente soluzione a cui assistiamo. La variabile sicuramente decisiva, in un mondo economicamente globalizzato è il costo, variabile poco nobile e pericolosa ma che motiva la soluzione C. Allora, la domanda di prima può trovare risposta in un'altra domanda: La sostenibilità è conveniente? Il concetto di "sviluppo sostenibile" si fonda proprio su questo aspetto e prova a cercare una risposta a tale quesito nell'equilibrio delle tre "E": ecologia, equità, economia. E' una forma di "sviluppo *che soddisfa i bisogni del presente senza compromettere la possibilità delle future generazioni di soddisfare i propri bisogni*" (rapporto di Brundtland-1987). L'obiettivo è di mantenere uno sviluppo economico operando in regime di equilibrio ambientale.

Letta con occhio cinico, la definizione di sviluppo sostenibile potrebbe essere tradotta come un processo socio-economico caratterizzato da un comportamento alla ricerca d'ideali; come dire che "*ciò che è reale è irrazionale; ciò che è ideale è irreal*"(G. Renzi). Se poi oltre al cinismo si aggiunge la critica, si potrebbe ammettere che l'obiettivo proposto dalla filosofia dello sviluppo sostenibile è dettato da una visione antropologica di sviluppo: al centro della questione non c'è tanto l'ecosistema, e quindi la sopravvivenza e il benessere di tutte le specie viventi, ma piuttosto le generazioni umane.

Una visione globale che consente di rendere più concreti i principi teorici dello sviluppo sostenibile, è fornita nel 1991 dalla World Conservation Union, nei quali la sostenibilità è concepita come *“un miglioramento della qualità della vita, senza eccedere la capacità di carico degli ecosistemi di supporto, dal quale essa dipende”*.

Esiste un indice statistico che stabilisce il carico per gli ecosistemi. E' l'impronta ecologica, che mette in relazione il consumo umano di risorse naturali con la capacità della terra di rigenerarle. Utilizzando l'impronta ecologica, secondo la Global Footprint Network, è possibile stimare quanti “pianeta terra” servirebbero per sostenere l'umanità qualora tutti vivessimo secondo un determinato stile di vita. Da alcuni studi effettuati su scala mondiale, emerge che l'impronta mondiale è maggiore della capacità bioproduttiva mondiale, cioè si consuma più velocemente di quanto si potrebbe, intaccando il capitale naturale e quello disponibile per il futuro. A rendere questi studi più tragici di quanto detto, è il fatto che il suddetto indice statistico misura l'area biologicamente produttiva di terra e mare capace di assorbire i rifiuti umani, ma non prende in considerazione l'approvvigionamento da fonti non rinnovabili, inquinamento da energia nucleare e scorie radioattive, e i consumi sono riferiti alle sole risorse rinnovabili. Di conseguenza il danno ambientale è molto più alto di quello che mostra l'impronta ecologica secondo cui, già nel 1999, l'umanità usava il 120 % della capacità globale della biosfera.

Nel 2001, l'UNESCO aggiunge il quarto pilastro dello sviluppo sostenibile, ovvero la diversità culturale *“necessaria per l'umanità quanto la biodiversità per la natura”*. Questo nuovo concetto di sviluppo sostenibile contribuisce a generare approcci multidisciplinari sia nelle iniziative politiche sia nella ricerca, sino a giungere alla norma ISO 26000

“ Guida sulla responsabilità sociale” che mira a fornire una guida etica per tutti i tipi di organizzazioni sociali.

Quante nozioni empiriche, razionali ed efficaci ci sono dentro questo concetto di sostenibilità ambientale? In realtà ci sono dei presupposti che si devono tener presenti dalla traduzione del pensiero di sostenibilità alla messa in pratica di movimenti politici, economici e sociali. Come primo punto, bisogna considerare che l'economia moderna dipende dalle risorse non rinnovabili che, com'è noto, si contraddistinguono per l'elevato impatto ambientale. Il PIL (prodotto interno lordo) di molti paesi dipende da tali risorse; si potrebbe persino dire che i paesi più ricchi sono quelli che possiedono questi beni, ed è facile dedurre la diretta proporzionalità tra PIL e risorse non rinnovabili. Sulla constatazione di questo dato si sviluppa un concetto politico che si può sintetizzare in un sostantivo: Decrescita. Coniato da Nicholas Georgescu- Roegen, fondatore della bioeconomia, il termine decrescita indica l'impossibilità che un solo indicatore economico, il PIL, cresca costantemente con conseguente rispetto dell'ecosistema terra. La teoria della decrescita sostenibile non implica il perseguimento della decrescita in sé per sé. Si pone come mezzo la ricerca di una qualità di vita migliore, senza aumentare il consumo ma attraverso altre strade e per questo propone di smettere di utilizzare il PIL come unica bussola d'indice di benessere. Esso non misura la crescita del benessere, ma solo quella delle merci e degli scambi di tipo mercantile che corrisponde a uno scambio di prodotti con denaro, senza per forza costituire uno stimolo della crescita dei beni prodotti. Non può essere il costo il vero protagonista del rinnovamento. Il duello ecologia-economia è paradossale persino etimologicamente parlando. La desinenza comune delle due parole dal greco *oikos*, “casa”, si traduce in una inaspettata contraddizione tra lo studio di essa, *logos*, e la sua gestione, *nomos*.

L'uomo sarà anche l'essere vivente più evoluto ad abitare il pianeta Terra, ma se questa superiorità lo porta soltanto a usare violenza indiscriminata contro tutto ciò che non è se stesso, allora forse in questo caso la selezione naturale avrebbe potuto fare meglio. La mancanza di sensibilità e di azioni è probabilmente legata ad una visione a breve termine del problema ambiente. Non bisognerebbe dimenticare che il rapporto che intercorre tra l'uomo e l'ecosistema è d'interazione, ovvero, tanto l'ambiente quanto l'uomo tendono a modificarsi a vicenda. L'adattamento dell'ambiente alle esigenze dell'uomo ha portato alla trasformazione di quasi tutti gli ecosistemi con la pericolosa conseguenza di aver alterato l'equilibrio su scala planetaria. Le catastrofi metereologiche degli ultimi anni ne sono una prova; tangibili sono le conseguenze che questi eventi hanno sull'uomo e queste non sono le uniche manifestazioni dell'insofferenza della terra. Essa agisce, com'è stato sempre nei millenni dei millenni, anche in una serie di pressioni selettive che finiscono per tradursi in mutazioni genetiche non sempre vantaggiose per le specie. Con uno sguardo a corto raggio, le conseguenze sulla qualità di vita sono molteplici e dolorose. Con effetto boomerang, infatti, l'inquinamento prodotto dall'uomo s'imprime e si manifesta in molte forme di patologie e malattie spesso fatali per l'individuo; tempo e risorse sono spesi per sconfiggere leucemie varie, infinite forme di cancro, e ricerca di soluzioni. Se volessimo rispondere alla domanda iniziale, quanto costa la sostenibilità, la risposta potrebbe essere che costa più non essere sostenibile che esserlo.

Un'ingiustificata fiducia nella bontà del progresso ha fatto sì che, l'innovazione tecnologica, non si accompagnasse a studi su possibili seguiti negativi. Per smorzare la dicotomia tra la crescente domanda di beni e servizi e il loro impatto sull'ambiente, sono necessarie manovre politiche che abbiano come basi informazioni affidabili che fungano da specchio

delle reali minacce ma anche dei mali non visibili. Questo vuol dire avere strumenti di allarme precoci che possano contribuire alla ricerca di soluzioni incisive ed efficaci.

E' dalla conoscenza di ciò che abbiamo intorno che si può pensare a un serio programma di recupero e sostenibilità ambientale. L'analisi e la valutazione dei rischi, può essere una strada alla prevenzione e programmazione e il monitoraggio ambientale deve essere concepito come il pilastro centrale della politica ambientale.

Introduzione

Monitoraggio ambientale

Alcune sostanze possono costituire un immediato pericolo per la salute dell'ambiente e dell'individuo; altre, pur essendo apparentemente innocue, possono diventarlo col tempo. Le pressioni antropiche sono determinanti nella rottura degli equilibri naturali di molte sostanze, e lo strumento che permette di misurare il reale rapporto causa-effetto tra l'attività umana e il cambiamento ambientale è il monitoraggio ambientale.

Il termine monitoraggio deriva dal latino monitor-oris, che significa appunto ammonire, avvisare, consigliare. L'impatto di una sostanza sull'ambiente è valutato tramite l'ausilio di strumenti specifici che sono gli indicatori, ovvero valori assoluti o valori di soglia che indicano presenza, concentrazione, ed effetti misurabili con incertezze di misure ridotte al minimo. Un indicatore è un attributo, che caratterizza in maniera quantitativa o qualitativa, una qualunque condizione dell'entità osservata (Giupponi, 1998), sia con funzione conoscitiva, sia come base per gli interventi di programmazione. Qualsiasi parametro può essere un indicatore purchè possa essere interpretato in chiave valutativa favorendo così l'analisi di situazioni complesse, la rappresentazione sintetica del comportamento di un'entità nonché il trasferimento di informazioni ad organi decisionali. Agli indicatori si chiede, oltre che rappresentare lo stato dei nostri sistemi, di orientare i sistemi di governo e i programmi d'azione, nonostante essi abbiano un pur minimo contenuto soggettivo influenzato dalla formazione dell'operatore che ne fa uso. Un buon indicatore dovrebbe essere rappresentativo, ossia correlabile con il fenomeno da controllare, facilmente misurabile ed avere un'adeguata valenza analitica intesa come base tecnico-scientifica di modelli standard internazionali. Altre caratteristiche degli indicatori sono la precisione e la chiarezza delle informazioni ottenute, ma

anche la sensibilità intesa come capacità di descrivere prontamente i cambiamenti spazio-temporali.

Lo studio degli ecosistemi, mediante indicatori, fa riferimento al modello PSR proposto da Anthony Friend negli anni 70. Tale modello Pressione-Stato-Risposta (PSR) evidenzia relazioni tra sistemi ambientali e attività antropiche. Esso è basato sul concetto di causalità: le attività umane esercitano pressioni sull'ambiente e modificano la qualità e la quantità delle risorse, cioè lo stato dell'ambiente. Le risposte della società a tali cambiamenti avvengono attraverso politiche ambientali, economiche e settoriali, determinando un ciclo retroattivo con le pressioni e determinando altre attività e altri impatti sull'ambiente. Questo modello si basa sul concetto di causa/effetto e prevede una serie di indicatori ambientali suddivisi in:

- ❖ indicatori di pressione, ossia le attività umane che costituiscono fonti di pressione sui vari comparti ambientali.
- ❖ indicatori di stato, cioè la qualità dell'ambiente e le sue alterazioni;
- ❖ indicatori di risposta, provvedimenti atti a migliorare lo stato dell'ambiente.

Gli indicatori ambientali di stato più appropriati per indagare i rischi ambientali sono quelli chimici e biologici. Gli indicatori chimici permettono di conoscere le sostanze che causano inquinamento e la loro concentrazione, ma hanno dei limiti, quali fornire solo un dato istantaneo, non rendere evidenti certi inquinanti, e non dare una valutazione complessiva sull'azione sinergica degli inquinanti. Gli indicatori biologici integrano le analisi chimiche superando i limiti imposti da questi ultimi,

grazie al fatto che consentono di qualificare il livello di alcuni elementi presenti anche in traccia e di valutare gli effetti reali e potenziali dell'inquinamento. Dal punto di vista metodologico gli indicatori biologici possono seguire due percorsi. Il primo di tipo induttivo, nasce in laboratorio e parte dallo studio di determinate sostanze per verificarne gli effetti; è basato sulla sperimentazione in laboratorio su animali o sistemi cellulari in vitro, fornendo informazioni sull'attività tossicologica e mutagenica delle sostanze in esame. Il secondo percorso è l'approccio epidemiologico e deduttivo. In questo caso dall'individuazione dell'effetto si risale alla causa; consiste nella stima dell'incidenza di un dato danno e nell'individuazione dei fattori attraverso gli effetti di agenti chimici sugli organismi viventi all'interno degli ecosistemi.

Indicatori chimici

Dal punto di vista operativo la scelta di un indicatore deve tenere conto dello specifico obiettivo prefissato nell'indagine. Qualora si persegue come scopo la descrizione o l'evoluzione del sistema nel tempo, si prediligono indicatori di stato o informative indicator di cui gli indicatori chimici sono un esempio. Derivano dalla valutazione di parametri abiotici del sistema analizzato. Quando il sistema studiato è l'acqua, i parametri più osservati sono temperatura, salinità e pH, e in dipendenza dallo scopo della ricerca, valutazione quali-quantitativa di sostanze specifiche.

SPME

La Solid Phase Microextraction (SPME) è una tecnica che ha reso possibile l'estrazione nonché l'identificazione di sostanze volatili e semi-volatili da varie matrici solide, liquide o gassose (di origine ambientale, biologica e alimentare).

Negli ultimi anni, ha acquisito una grande popolarità per la sensibilità, semplicità, efficienza e i costi più contenuti che la caratterizzano rispetto ad altre procedure di estrazione e quindi individuazione.

Il metodo è stato introdotto nel 1989 da Janusz Pawliszyn, viene routinariamente usato in combinazione con la Gas-Cromatografia, l'HPLC, l'elettroforesi capillare, ed è ideale per l'accoppiamento con la Spettrometria di massa.

Il dispositivo è molto semplice: un sistema a "siringa" in cui vengono usati piccoli segmenti di fibre di silice fusa ricoperte da un' opportuna fase stazionaria (Fig. 1).

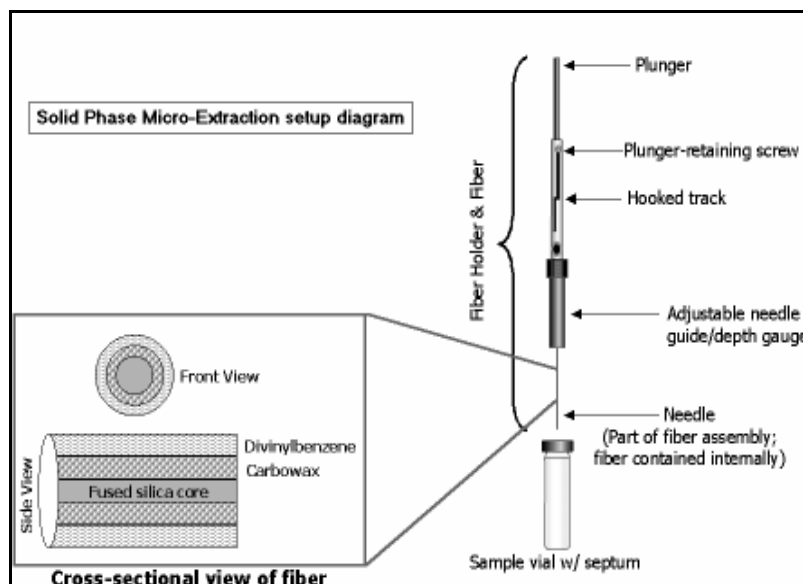


Figura 1. schema di un dispositivo SPME.

La fibra è saldata alla parte terminale di un'anima di acciaio che scorre all'interno di un ago cavo che la protegge. Lo stantuffo dell'apparecchiatura permette l'esposizione della fibra nel campione e, dopo un opportuno tempo di campionamento, viene ritratto. La fibra viene quindi inserita per la fase di desorbimento all'interno del sistema di iniezione di un cromatografo.

Le fibre per SPME devono avere determinate caratteristiche: di norma, hanno una lunghezza di 1 o 2 cm, devono essere chimicamente inerti e stabili ad alte temperature ($< 300\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Le fibre sono rivestite con una fase polimerica simile a quelle utilizzate per colonne gas-cromatografiche. Sono disponibili rivestimenti di varia polarità e con spessori variabili da 7 a $100\text{ }\mu\text{m}$. In base alle loro caratteristiche di polarità, le fibre possono essere distinte in non-polari, polari e bi-polari (Vas e Vekey, 2004).

La possibilità di disporre di fibre a diverso spessore e polarità permette di effettuare campionamenti selettivi in funzione dei pesi molecolari, della polarità e volatilità degli analiti.

L'estrazione nella tecnica SPME può essere effettuata in due modi:

- Immergendo direttamente la fibra nel campione liquido, DIRECT-SPME (sistema a due fasi)
- Esponendo la fibra nello spazio di testa del campione, cioè nella fase vapore sovrastante il campione, HEAD SPACE-SPME (sistema a tre fasi).

In entrambi i casi, si assiste all'instaurarsi di equilibri tra l'analita nel campione (soluzione o fase vapore sopra il campione) e il polimero che ricopre la fibra di silice fusa. La quantità di sostanza adsorbita dalla fibra dipende dallo spessore del polimero di rivestimento e dalla costante di distribuzione dell'analita.

Il tempo di estrazione sarà determinato dal tempo richiesto per estrarre gli analiti con la costante di distribuzione (campione/fibra) più elevata; generalmente, essa aumenta all'aumentare del peso molecolare e del punto di ebollizione dell'analita.

Tra le metodiche di estrazione in fase gassosa viene fatta un'ulteriore distinzione tra la tecnica dello Spazio di testa statico e dinamico (static- e dynamic-HS). Nello HS-statico, il campione in soluzione o disperso in un opportuno solvente, viene ermeticamente chiuso in un idoneo contenitore, che viene riempito solo parzialmente; il contenitore viene immerso in un bagno termostato e riscaldato a una temperatura tale da favorire il passaggio dei composti in fase vapore, permettendo il raggiungimento dell'equilibrio tra i composti volatili presenti nella matrice e quelli nella fase vapore. Lo spazio di testa si satura quindi dei componenti volatili presenti nel campione ed un volume prefissato della fase gassosa viene poi prelevato con una siringa a tenuta di gas e iniettato in un gas-cromatografo. In alternativa, gli analiti volatili presenti in fase vapore vengono fatti adsorbire su una fibra SPME e mediante desorbimento termico analizzati in

un Gas-Cromatografo.

Nello HS-dinamico, gli analiti sono convogliati mediante un gas inerte e puro (quale He o N₂) su una trappola di materiale adsorbente (Tenax), in grado di trattenerli e concentrarli.

Commercializzata dal 1993 dalla Supelco, l' SPME è stata accoppiata alla GC ed è oggi una tecnica molto usata per la determinazione di farmaci, contaminanti ambientali ed ogni tipo di composto biologicamente attivo o di interesse tossicologico

Gas Cromatografia

La gascromatografia (GC) è una tecnica cromatografica impiegata a scopo analitico che si basa sulla diversa ripartizione di differenti sostanze tra una fase stazionaria ed una fase mobile, in funzione dell'affinità di ogni sostanza con la fase stazionaria. La fase mobile è un gas permanente, solitamente idrogeno, elio o azoto, (carier) che fluisce attraverso una colonna in cui è posta la fase stazionaria, che può essere costituita da un liquido non volatile supportato su una polvere che riempie uniformemente una colonna ("colonna impaccata"), oppure distribuito come film sottile spesso qualche micrometro sulla parete interna di una colonna di lunghezza superiore ai 10 metri e di diametro inferiore al millimetro ("colonna capillare").

Quando il campione esce dall'estremità finale della colonna viene raccolto da un rivelatore, i più comuni dei quali sono a conducibilità termica, a ionizzazione di fiamma (o FID) e a cattura di elettroni (o ECD). Il diagramma che rappresenta il segnale generato dal rivelatore in funzione del tempo, è il cromatogramma del campione che si presenta come una sequenza di picchi di varia ampiezza ed altezza distribuiti lungo l'asse del tempo. Dal tempo di ritenzione di ogni picco è possibile dedurre l'identità

del composto eluito; dall'area o dall'altezza dei picchi è possibile dedurre le concentrazioni o le quantità assolute dei vari composti presenti nel campione analizzato, a seconda del rivelatore impiegato.

Indicatori biologici

È prassi ormai consolidata affiancare ad indicatori abiotici anche indicatori biotici (o bioindicatori) per la valutazione di matrici complesse. I bioindicatori rappresentano, mediante variazioni identificabili nel loro stato (dal punto di vista biochimico, fisiologico, morfologico, etc), la risposta degli ecosistemi ad una situazione di stress. Si riconosce una scala gerarchica nella risposta dei sistemi biologici allo stress, che va dalla molecola fino alle comunità nel loro insieme.

Progredendo da sistemi più semplici a quelli più complessi aumenta la difficoltà di correlare causa ed effetti, cambia l'importanza ecologica delle alterazioni ed il tempo di risposta.

Il monitoraggio biologico ruota intorno l'osservazione di tali cambiamenti o biomarcatori, valutando diversi livelli di complessità degli indicatori (Fig. 2).

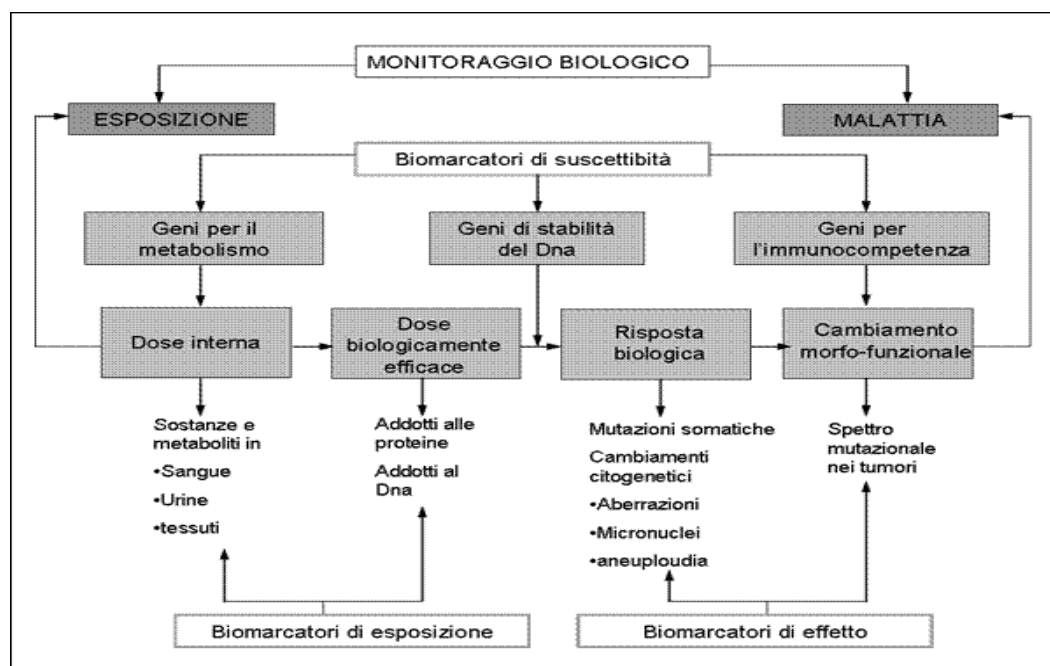


Figura 2. Monitoraggio biologico (Rudiger 1999).

Sono stabiliti tre tipi di marcatori (Fig. 2): biomarcatori di esposizione o di dose interna; di effetto, che rappresentano una conseguenza dell'esposizione e possono essere rappresentati da una funzione biologica alterata; di suscettibilità, esistenti precedentemente e indipendentemente dall'esposizione, che danno un'informazione sulla probabilità che una patologia si manifesti in conseguenza di un'esposizione esterna. I primi due tipi sono l'immediata risposta e relazione causa-effetto dei danni dell'ambiente sull'ecosistema: dopo poche ore dall'esposizione ad un contaminante possono avvenire nelle cellule degli organismi variazioni a livello delle componenti biochimiche, di struttura o di funzione che rappresenta la misura dell'accumulo e della tossicità del composto. In questo contesto gli agenti mutageni e/o cancerogeni si distinguono da altri agenti tossici in quanto inducono modifiche stabili dell'informazione genetica, ereditabili dalle cellule replicate e in generazioni successive, i cui effetti possono esplicarsi ben oltre la fine dell'esposizione, con ripercussione nella parte apicale della scala gerarchica. L'attenzione sull'analisi delle modifiche, nonché sulle mutazioni, a carico del DNA, permettono di esaminare l'effetto di sostanze, presente anche in traccia, che difatti hanno delle conseguenze, oltre che immediate nel futuro, entrando in percorsi di bioaccumulo e di biomagnificazione.

Mutagenesi Ambientale

La Mutagenesi Ambientale è una disciplina molto vasta e in continua evoluzione, che nasce come appendice della genetica e che è attualmente collegata a diversi settori scientifici quali: la Medicina, l'Ecologia, la Chimica e la Fisica. Tale disciplina studia i meccanismi molecolari e biochimici d' insorgenza di mutazioni spontanee a livello del DNA o prodotte da agenti chimici o fisici esterni all'organismo in esame e le conseguenze da esse derivanti.

Ha avuto un forte impulso nel periodo bellico del secolo scorso, a causa della scoperta di effetti genetici negativi del gas mostarda utilizzato durante il primo conflitto mondiale (Stevens et al., 1950), e degli effetti delle radiazioni ionizzanti nella seconda guerra mondiale. L'ispiratrice della mutagenesi chimica prima, e di quella ambientale dopo, Charlotte Auerbach affermò che: *“le sostanze chimiche con proprietà mutagene dovrebbero essere particolari strumenti per analizzare i problemi connessi con le mutazioni. Se, come noi assumiamo la mutazione è un processo chimico, di conseguenza la conoscenza dei reagenti chimici capaci di iniziare questo processo dovrebbe chiarire non soltanto la stessa reazione, ma anche la natura del gene, l'altro partner della reazione”*(Auerbach e Robson, 1947). Questa ipotesi che guida la nascita della mutagenesi ambientale, non solo trova la relazione tra mutazioni e sostanze, ma antepone la conoscenza della sostanza alla comprensione delle mutazioni.

Nel 1976 il Congresso degli Stati Uniti, *Toxic Substances Control Act* (TSCA), regola la registrazione delle nuove sostanze chimiche immesse sul mercato statunitense e per la prima volta afferma il principio secondo il quale le sostanze chimiche devono essere sottoposte a studi di valutazione delle proprietà cancerogene, mutagene e teratogene attraverso metodi

rapidi, economici e ripetibili (Public law 94-469, 94th Congress). Il consiglio Europeo tre anni dopo adotta questa regolamentazione (67/548/CEE) e approva la modifica alla direttiva 79/831/CEE che impone al produttore di una nuova sostanza di presentare un dossier contenente una serie di informazioni tra cui: studi di tossicità e nello specifico di mutagenicità, mediante l'applicazione di due metodiche per la valutazione di essa, una di natura batterica e un test non batterico. Tale legge nata con l'obiettivo di ravvicinare le disposizioni legislative, regolamentari e amministrative relative alla "Classificazione, imballaggio ed etichettatura delle sostanze pericolose", è diventata il sistema unico normativo a livello europeo d'individuazione dei pericoli associati all'uso di sostanze chimiche, per conoscere il più possibile tali pericoli prima che le sostanze siano commercializzate e utilizzate, con eventuali conseguenti danni per la salute umana e per l'ambiente. Ha avuto sette modifiche e ventinove adeguamenti, di cui l'ultima il 22 marzo del 2007, tuttora in vigore.

Il monitoraggio ambientale, trova negli studi di mutagenesi un supporto fondamentale per la valutazione della pericolosità di una sostanza. Non a caso la scienza della ecotossicologia, che alla luce della relazione sostanza-mutazione è divenuta ecogenitossicologia, utilizza l'applicazione dei test di mutagenesi specie "a breve termine" (per cui il rapporto costo/benefici è assolutamente favorevole), per la rilevazione di sostanze potenzialmente mutagene presenti spesso in miscele complesse nell'ambiente di vita sia esterno (outdoor) (aria, acqua, suolo etc) che interno (indoor) (aree abitative o ambienti di lavoro).

Le mutazioni sono classificate a seconda della loro estensione, in mutazioni geniche, quando il cambiamento dell'informazione genetica riguarda uno o pochi nucleotidi; mutazioni cromosomiche (o alterazioni cromosomiche) che interessano la struttura dei cromosomi ed infine in

mutazioni genomiche quando riguardano l'intero assetto genomico. Saggi che permettono di valutare diversi tipi di mutazioni sono inseriti in tabella I e in allegati guida della direttiva 79/831/CEE, per lo studio della potenziale pericolosità di sostanze utilizzate e immesse nell'ambiente in diversi ambiti dell'attività umana.

SAGGI PER LA MISURA DELL'INDUZIONE DI MUTAZIONI GENICHE	Test di reversione genica in <i>Salmonella typhimurium</i> Test di reversione genica in <i>Escherichia coli</i> Mutazione genica in cellule di mammifero in coltura Saggio di rilevazione di mutazioni recessive/letali sex-linked in <i>Drosophila</i> Mutazione genica in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mouse spot test
SAGGI PER LA MISURA DELL'INDUZIONE DI ABERRAZIONI CROMOSOMICHE	Saggio citogenetico in vitro Saggio citogenetico in vivo Test dei micronuclei Saggio dei dominanti/letali Saggio delle traslocazioni ereditabili Saggio citogenetico in cellule germinali di mammifero
SAGGI PER LA MISURA DEGLI EFFETTI SUL DNA	Danno e riparazione del DNA, sintesi non programmata di DNA in vitro Ricombinazione mitotica in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Scambi tra cromatidi fratelli in vitro

Tabella I. Sintesi dei saggi di mutagenicità

Test di Ames

Prende il nome dallo scienziato che negli anni 70 mise a punto un test batterico per lo studio dell'attività mutagena dei composti chimici. Il merito di Ames è stato quello di proporre un test semplice ma allo stesso tempo

molto accurato. I ceppi impiegati infatti, sono stati caratterizzati dal punto di vista genetico in maniera dettagliata e precisa in modo tale che fosse possibile identificare il tipo di mutazione indotta; inoltre Ames introdusse l'uso di un sistema di attivazione metabolica esterno (S9) che fosse capace di attivare i promutageni, cioè di attivare tutte quelle sostanze che non sono di per se mutagene ma che lo diventano in seguito alla trasformazione chimica operata dagli enzimi del metabolismo cellulare.

Il test di Ames è in grado di rilevare le capacità mutagene di un composto, cioè la capacità di interagire con la molecola del DNA, attraverso la reversione al fenotipo selvatico di ceppi di *Salmonella typhimurium*, che presentano una mutazione puntiforme in uno dei geni responsabili della biosintesi dell'istidina per cui questi batteri per crescere hanno bisogno di tale amminoacido (ceppi his- auxotrofi per l'istidina). Possono essere impiegati diversi ceppi ciascuno dei quali è caratterizzato da una mutazione di natura molecolare diversa (sostituzioni di basi, inserzioni, delezioni).

La Salmonella è l'agente patogeno più comunemente riscontrato nei casi di infezioni alimentare sia sporadiche che epidemiche.

Esistono numerosi tipi di Salmonella, ma quelle più conosciute sono *S. enteridis* e *S. typhimurium*.

Le salmonelle causano diarrea, febbre e crampi addominali nel giro di 12-72 ore dall'infezione. Generalmente la guarigione avviene nel giro di 4-7 giorni, senza particolari trattamenti.

La Salmonella è un entero-batterio che vive nell'intestino degli uomini e degli animali. Il contagio avviene attraverso l'ingestione di carne cruda, uova, pollame, latte non pastorizzato. Anche le verdure irrigate con acque contaminate possono essere veicolo d'infezione. Per evitare la contaminazione basta la cottura dei cibi ed una rigorosa igiene da parte di

chi tratta gli alimenti.

Il test utilizza ceppi di *Salmonella typhimurium* disattivati, e quindi non pericolosi per la salute dell'operatore; questi batteri non possono crescere in assenza di istidina, a causa di una mutazione avvenuta in un gene dell'operone istidina (insieme di geni deputati alla biosintesi di uno stesso prodotto). Questi mutanti auxotrofici sono chiamati istidina dipendenti o his-. Esistono diversi ceppi mutati di salmonella che differiscono per il tipo di mutazione e quindi possono essere impiegati per individuare mutageni diversi (Gee et al.,1994):

- * TA1535 presenta una mutazione missense nel gene his G che codifica per il primo enzima della biosintesi dell'istidina (Fosforibosiladenosina trifosfato pirofosforilasi). La mutazione causa la sostituzione dell'amminoacido leucina con la prolina.
- * TA100 deriva ceppo TA1535 nel quale è stato introdotto il plasmide pKM101 che conferisce resistenza all'ampicillina.
- * TA1538 presenta una mutazione frameshift (inserzione di una base) nel gene his D che codifica per l'istidinol deidrogenasi.
- * TA98 deriva dal ceppo TA1538 nel quale è stato introdotto il plasmide pKM101.

Tutti questi ceppi inoltre presentano due mutazioni che incrementano la capacità di individuare i mutageni:

Tutti questi ceppi inoltre presentano due mutazioni che incrementano la capacità di individuare i mutageni:

- Mutazione del locus rfa causa la parziale perdita del lipopolisaccaride che ricopre la membrana del batterio. Questa mutazione aumenta la permeabilità di membrana soprattutto verso le molecole di grandi

dimensioni come ad esempio il benzopirene che non penetrerebbe attraverso la membrana integra.

- Delezione del gene *uvrB*, locus che codifica per un enzima del sistema di riparazione. La perdita di questo aumenta la sensibilità dei batteri verso potenziali mutageni. Inoltre l'escissione causa la parziale perdita del gene *bio* per cui i batteri nel loro terreno di crescita necessitano, oltre l'istidina, della biotina. I ceppi TA1535 e TA100 vengono impiegati per individuare le sostanze mutagene che inducono sostituzioni di basi, mentre i ceppi TA1538 e TA98 sono impiegati per rivelare i mutageni che inducono inserzioni o delezioni di basi nel DNA. Inoltre ogni ceppo presenta un numero di revertenti spontanei: TA1535 e TA100 da 120 a 200.

Il test prevede due tipi di esperimenti:

☉ Spot test-qualitativo

☉ Plate test-quantitativo

Spot test

Dà un'indicazione della genotossicità della sostanza da saggiare e quindi delle dosi da utilizzare nel plate test. In una piastra Petri con terreno minimo è seminata una determinata quantità di cellule batteriche ($\sim 10^8$), al centro è poi posto un dischetto di carta imbevuto con la sostanza chimica da analizzare a concentrazione nota. La diffusione della sostanza nell'agar determina un gradiente di concentrazione. Se la concentrazione è troppo alta, l'effetto tossico impedirà lo sviluppo cellulare e si osserverà un alone di inibizione. Viceversa se la concentrazione non è tossica si potranno osservare i revertenti eventualmente prodotti.

Plate test

E' il metodo più usato: è ad esso che si fa normalmente riferimento quando si parla di “test di Ames”. Prevede l’aggiunta della sostanza da saggiare direttamente al top agar in cui sono stati aggiunti i batteri; il tutto viene poi stratificato su una piastra di terreno selettivo. Nel plate test possono essere impiegati dei preparati microsomiali, S9, che servono per l’attivazione di mutageni indiretti, cioè per quella categoria di mutageni che diventano tali a seguito di trasformazioni operate dal metabolismo cellulare.

Il Test del locus HGPRT

Per valutare la capacità mutagenica di una sostanza possono essere utilizzati, oltre ai batteri, anche gli eucarioti. In particolare può essere utilizzato il test del locus HGPRT delle V79 di Hamster cinese. Il principio del test si basa sulla capacità che hanno le mutazioni geniche (sostituzione di base, mutazioni frameshift o piccole delezioni) di determinare il cambiamento della sequenza nucleotidica con la conseguente perdita dell'attività dell'enzima e selezione dei mutanti 6tioguanina-resistenti (de Bruyn, 1976).

Il gene HGPRT è localizzato sul cromosoma X sia nell'uomo che nei roditori; codifica per l'enzima ipoxantina guanina fosfo-ribosiltrasferasi, enzima coinvolto nella via di salvataggio dei nucleotidi purinici. Quest'enzima catalizza la fosforibosilazione di ipoxantina e guanina libere, formando IMP e GMP precursori dei nucleotidi che verranno utilizzati nella sintesi del DNA. L'HGPRT può anche riconoscere e fosforibosilare degli analoghi di base, tra cui la 6-tioguanina. Tale analogo è tossico, perché dopo l'evento della fosforibosilazione può essere incorporato negli acidi nucleici. La presenza di nucleotidi estranei avvia nella cellula una serie di risposte atte a riparare il danno, risposte che però portano la cellula inevitabilmente a morte (Casciano et al., 1999).

La scelta del gene HGPRT è fondata sul fatto che la mancanza di tale enzima non è letale per le cellule (i nucleotidi purinici possono essere sintetizzati attraverso la via de novo), inoltre nelle cellule V79 di Hamster Chinese (cellule maschili), il gene localizzato sul cromosoma X è presente quindi in emizigosi. E' di fondamentale importanza che il gene si trovi in singola copia, cosicché il fenotipo resistente è già evidente non appena una singola mutazione avvenga nel gene. Infatti è più probabile che la mutazione

cada in un solo gene piuttosto che in due copie di uno stesso gene. Inoltre se ci fossero due copie funzionanti, una singola mutazione non sarebbe sufficiente a conferire resistenza, perché sarebbe comunque presente l'altra copia del gene, che continuerebbe a produrre un enzima perfettamente funzionante. In alternativa alle V79 possono essere utilizzate per questo test le cellule CHO, cellule di ovario di Hamster cinese, che presentano un'emizigosi funzionale, poiché uno dei due cromosomi X è silenziato in quanto eterocromatico.

Le cellule, dopo il trattamento con la sostanza da analizzare, vengono fatte crescere in un terreno addizionato con 6tioguanina. Se la sostanza è mutagena ed ha indotto una mutazione al locus HGPRT, l'enzima codificato non sarà funzionante; la 6tioguanina, pur essendo presente nel mezzo, non sarà incorporata nel DNA e quindi le cellule potranno sopravvivere; le cellule che non hanno subito alcuna mutazione, avendo l'enzima funzionante, verranno invece selezionate negativamente.

Comet assay

Il comet assay, chiamato anche SCGE (single cell gel electrophoresis), è una tecnica microelettroforetica tramite la quale si possono visualizzare, in modo diretto, i danni al DNA su singole cellule, causati da agenti chimici e fisici.

È una tecnica rapida, economica, non-invasiva, molto sensibile ideata nel 1984 da Östling e Johanson. Nel corso degli anni questa tecnica, ha subito diverse modifiche e perfezionamenti che ne hanno consentito una rapida diffusione. Uno dei vantaggi di questo test è che necessita di una piccola quantità di campione cellulare, e si può applicare su tutti i tipi di

cellule eucariotiche, sia sulle differenziate che sulle proliferanti, sia sulle normali che sulle trasformate. Permette inoltre di quantificare il grado di danneggiamento e di riparazione in vivo e in vitro, non solo in tutte le cellule eucariotiche ma anche in alcuni tipi cellulari procariotici.

Il danno rilevato tramite questo metodo può essere causato da vari meccanismi, come rotture a singolo e a doppio filamento nel DNA, presenza di addotti, oppure può essere dovuto ad alterazioni convertibili in rotture, come i siti alcali labili o le incisioni causate dalle attività di riparazione per escissione dei nucleotidi (Moller et al., 2000).

Al microscopio a fluorescenza il danno del DNA, avvenuto in una singola cellula, evidenziato dal comet assay, appare simile ad una “cometa”. E’ possibile distinguere una “testa”, costituita da DNA intatto, e una “coda”, formata dai frammenti derivati dalla rottura del DNA o da DNA danneggiato che migrano sotto l’azione del campo elettroforetico.

Il comet assay può essere eseguito in condizioni neutre o alcaline. Le due varianti della tecnica permettono di evidenziare danni diversi: la versione neutra mette in evidenza le rotture a doppia elica mentre la versione alcalina evidenzia, non solo le rotture a doppia, ma anche quelle a singola elica, inoltre a pH >13 si possono mettere in luce i siti labili agli alcali.

I danni alle cellule vengono analizzati sia con parametri qualitativi che quantitativi. I parametri qualitativi prevedono la classificazione delle cellule in: nuclei compatti, nuclei con coda piccola e nuclei con coda estesa. Questa valutazione è eseguita su 1000 nuclei. Le analisi quantitative sono invece eseguite mediante dei software (Fig. 3) che permettono di avere parametri quali la percentuale di DNA nella coda, la sua lunghezza, ed il grado di frammentazione del DNA espresso da un parametro definito momento della coda (TM o OTM).

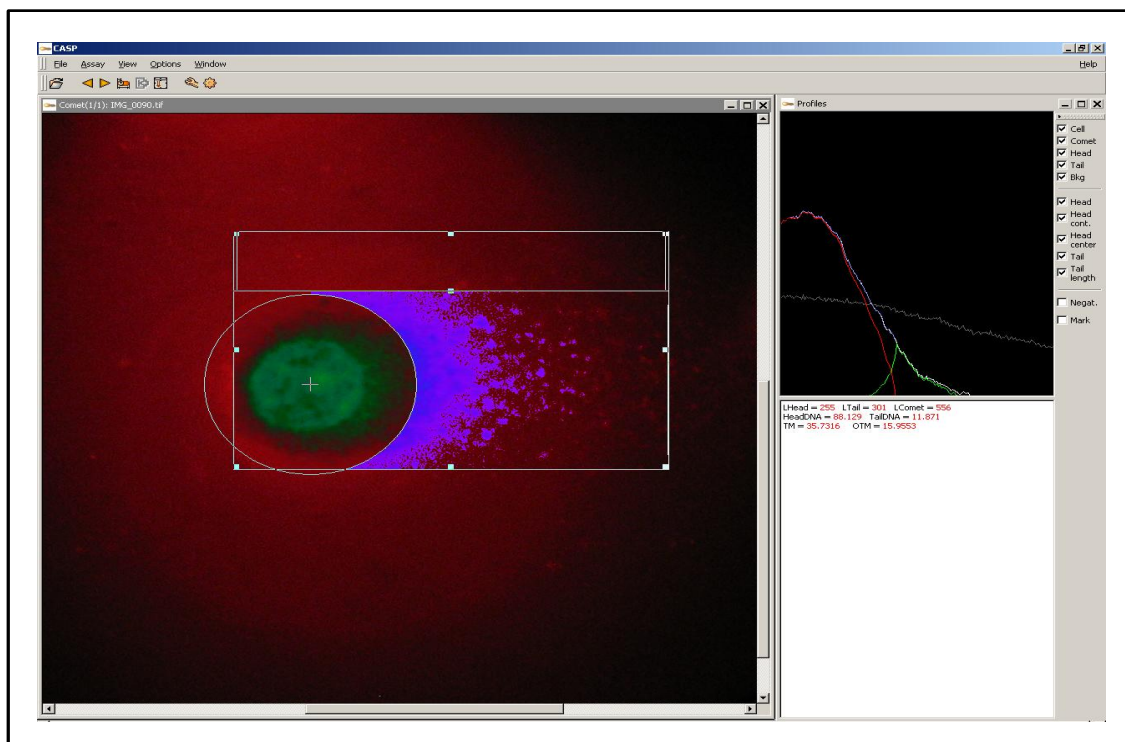


Figura 3. Immagine del softwar Casp

Obiettivi della ricerca

Questo elaborato nasce da esigenze prettamente legate al territorio Sicilia, ma che possono allargarsi a tutte quelle zone in cui l'attività agricola è molto intensa ed è considerata tra le prime fonti di ricchezza. La Sicilia occupa un posto di rilievo nella produzione mondiale degli agrumi, con una quota attorno al 5%, paragonabile alla produzione giapponese e spagnola.

Dati approssimativi stimati dell'ISTAT riferiti al maggio 2007 mostrano l'entità della produzione degli agrumi.

	Superficie	Superficie	Produzione	Produzione	Produzione
	Totale	in	per ha	Totale	Raccolta
	(ha)	produzione	(q)	(q)	(q)
Agrumi	96.957	93.437	216,1	20.192.386	19.443.891
-Arancio	60.426	59.520	217,1	12.919.910	12.663.640
-Mandarino	6.099	5.819	176,5	1.026.815	996.590
-Clementina	3.460	3.350	184,0	616.430	608.370
-Limone	26.630	24.450	226,9	5.548.800	5.097.960
-Pompelmo	305	261	299,2	78.100	75.000
-Altri agrumi	37	37	63,0	2.331	2.331

Tabella II. Dati Istat 2007

La maggior parte degli agrumi è trasformata in succhi, oli ed essenze direttamente nel territorio, dalle ventiquattro mila aziende circa di trasformazioni dislocate in tutta la Sicilia. Ciò comporta che gli addetti ai lavori abbiano continuo contatto con questi frutti e che, inevitabilmente, prodotti di lavorazione e di scarto siano rilasciati nell'ambiente. Inoltre alcune sostanze naturali presente negli agrumi sono utilizzati per il loro caratteristico aroma in prodotti di cosmesi, profumi e detergenti, per cui il

contatto diretto ad alcuni composti non è limitato ai lavoratori di industrie di trasformazione degli agrumi, ma è consueto e diffuso per tutti gli individui.

E' importante quindi capire se e come sostanze apparentemente innocue, e abbondantemente presenti sul territorio, possano avere effetto negativo sugli individui e sull'ambiente.

Gli oli essenziali degli agrumi sono particolarmente ricchi di terpeni, i cui effetti sono stati sino a oggi poco studiati. Tuttavia studi relativamente recenti hanno mostrato possibili effetti mutageni di questa ampia classe di sostanze (Buhagiar et al., 1999; Lazutka et al., 2001; Mark et al., 1996).

Questo progetto di ricerca ha pertanto lo scopo di valutare gli effetti genotossici di quattro monoterpeni (α -pinene, β -pinene, D-limonene e Δ 3-carene) che sono presenti in modo ubiquitario nei vegetali e molto abbondanti principalmente negli agrumi e di verificare possibilità di utilizzare la fotocatalisi eterogenea (usata con successo per l'abbattimento di numerosi contaminanti organici) come sistema di depurazione in modo da avere la completa mineralizzazione di queste molecole.

Tramite l'ausilio di indicatori chimici prima e biologici dopo si è cercato di fare un quadro sulla presenza di tali terpeni in acque prese in considerazione e i possibili effetti mutageni connessi a tali sostanze.

Per quanto concerne la parte di monitoraggio ambientale di questo progetto di ricerca, sono stati fatti dei campionamenti di reflui di industria di trasformazione degli agrumi, scelti in base alla possibilità di riscontrare, nelle acque di lavaggio e di scolo, le molecole di interesse.

L'analisi mediante l'SPME associata a GC/FID ha consentito di individuare la tipologia e la concentrazione di alcuni terpeni presenti nelle acque campionate.

Tali campioni sono stati usati in laboratorio per la valutazione degli

effetti biologici dei terpeni e sono stati eseguiti esperimenti sia su sistemi cellulari procariotici che eucariotici, applicando test rapidi, ripetibili e a basso costo, che permettono di individuare eventuali danni al DNA.

I test sono stati eseguiti per la maggior parte dei casi, con soluzioni standard dei terpeni per ovviare ai problemi di contaminazione dei cellulari e per isolare l'effetto dei terpeni dagli effetti delle altre sostanze organiche presenti delle acque campionate.

Infine è stata applicata alle soluzioni sintetiche e ai reflui reali la fotocatalisi eterogenea.

Industria di trasformazione agrumaria

La tecnologia usata per processare il prodotto grezzo degli agrumi è più o meno identica in tutto il mondo e prevede le seguenti fasi:

❖ Lavaggio, spazzolatura, selezione ed eventuale calibratura



Figura 4. Vasche di

I frutti freschi raccolti vengono immagazzinati in silos per essere poi convogliati verso l'impianto di trasformazione. In prima fase, si eliminano tutti i materiali estranei che possono contaminare il succo e gli oli essenziali (Fig. 4). I frutti entrano successivamente nella lavatrice e passano attraverso degli aspersori che applicano alla frutta dei prodotti pulenti. Quindi passano attraverso delle spazzole che rimuovono delicatamente la polvere e le sostanze estranee. In seguito, i frutti vengono scaricati nel banco di selezione. Dopo l'eventuale calibratura, essi sono convogliati alle tramogge degli estrattori, tramite un nastro d'alimentazione inclinato, equipaggiato con deviatori regolabili.

❖ Trasformazione:

I processi di trasformazione, utilizzati nell'industria agrumaria, possono essere di vario tipo ma tutti danno origine a tre prodotti principali: succo, olio essenziale e pastazzo. Le percentuali relative di ogni singolo componente per unità di prodotto trasformato, sono all'incirca del 35-45 % per il succo, dello 0,2-0,5 % per l'olio essenziale e del 55-65 % per il pastazzo (scorze, polpe e semi).

I primi due costituiscono i prodotti principalmente vendibili, il terzo

viene, invece, considerato sottoprodotto a basso valore o scarto di lavorazione.

❖ Raffinazione del succo

I processi di lavorazione del succo differiscono a seconda della collocazione geografica, della taglia e delle quote di mercato delle aziende di trasformazione. La maggior parte del succo di arancia, limone, mandarino e pompelmo, viene pastorizzato ovvero sottoposto a trattamenti termici utilizzando temperature tra 90 e 95 °C per 15-60 sec e infine concentrati.

Va considerato che, soprattutto nei paesi del Mediterraneo, il succo proveniente dagli estrattori, prima di essere pastorizzato, viene sottoposto a procedimenti di ulteriore raffinazione (o depolpazione) che consentono di ridurre il contenuto di solidi sospesi fino al di sotto dello 0,5 %.

Raffinazione ed estrazione degli oli

Gli oli essenziali vengono estratti attraverso diversi metodi che si basano su principi meccanici, fisici o chimici. La scelta del metodo più opportuno è operata tenendo presente qual è la parte della pianta da cui estrarre l'olio e quali sono le caratteristiche dell'olio stesso.

- I metodi meccanici, estrazione per spremitura, sono i metodi più rapidi e semplici attualmente disponibili. Possono essere utilizzati soprattutto per ottenere gli oli dagli agrumi che contengono nell'epicarpo superficiale (buccia), un'elevata quantità di tasche schizogene (otricoli) e quindi di oli essenziali che si accumulano man mano che vengono sintetizzati dalla pianta. Possono essere compiuti a mano o attraverso delle macchine sfumatrici o pelatrici. Quest'ultimo metodo, utilizzato a livello industriale, prevede un tipo di estrazione a freddo. Con questa tecnica si ottiene un'emulsione di oli e acqua che successivamente viene separata con

apposite centrifughe (Song et al., 2000) .

- I metodi chimici, “enfleurage”, ormai poco usati, sono finalizzati all'estrazione degli oli dai fiori. Consistono nel porre i petali tra due lastre di vetro, ricoperte da uno strato di grasso solido. Dopo un periodo sufficientemente lungo per l'estrazione delle essenze si ottiene una pommade da cui, mediante opportuni solventi, si separano gli oli.

- I metodi fisici comprendono vari tipi di distillazione: diretta, in corrente di vapore e a pressione ridotta, che sono impiegati per l'estrazione degli oli dalle diverse parti della pianta. Il primo tipo di distillazione è effettuata in appositi sistemi costituiti da un bollitore, all'interno del quale è posta, immersa nell'acqua, la parte della pianta da cui estrarre gli oli. Il tutto è portato ad ebollizione; il vapore, passando attraverso una serpentina refrigerata, condensa e viene quindi raccolto in apposite ampole. Il limite di questa tecnica è rappresentato dalla temperatura che può danneggiare irreversibilmente i principi termolabili. La distillazione in corrente di vapore, fondamentalmente viene eseguita come la precedente distillazione, con l'unica eccezione che le parti della pianta non sono immerse direttamente nell'acqua ma si trovano al di sopra e vengono attraversate dal vapore. La distillazione a pressione ridotta sfrutta l'utilizzo del vuoto per la generazione del vapore, che si ottiene quindi ad una temperatura inferiore a 100°C. Questo metodo ovvia al problema del danno delle sostanze termolabili ed è efficace quanto la distillazione in corrente di vapore, ma ha il limite di essere onerosa. E' stato dimostrato che le varie componenti degli oli variano localizzazione a seconda dell'ora del giorno, della stagione o delle esigenze della pianta stessa (tempo Balsamico). Bisogna quindi considerare tutte queste variabili per ottenere una resa quantitativa e qualitativa migliore.

Gli oli possono anche essere estratti combinando distillazione ed

estrazione mediante solventi quali il diclorometano o l'esano, attraverso l'SPME, che però determina una resa inferiore rispetto a quella ottenuta con gli altri metodi (Schaefer et al., 1995; De la Calle et al., 1996; De Angelis et al., 1999, Angusto et al., 2000).

Per quanto riguarda la separazione delle singole componenti degli oli si possono utilizzare le tecniche cromatografiche, anche se oggi si preferisce ottenerle attraverso processi di sintesi.

Residui di lavorazione e trattamento delle acque reflue

In generale, le industrie agro-alimentari generano, durante i cicli di lavorazione, due tipi di residui: Residui di natura solida e residui liquidi. I primi sono caratterizzati dalla principale presenza di concentrazioni elevate di sostanze organiche, modeste concentrazioni di metalli pesanti, e moderata presenza di residui di antiparassitari e anticrittogamici. I secondi sono costituiti dalle acque di lavaggio dei frutti, dei containers, dei silos, delle apparecchiature e dalle acque e dai fanghi provenienti dalle centrifughe impiegate per la separazione delle essenze. Sono acque cariche di sostanze inquinanti. Gli effluenti vengono raccolti in grossi serbatoi e scaricati nelle fogne dopo un processo di purificazione e decantazione con fanghi attivi.

Gli impianti di depurazione presenti nell'industria agrumaria sono, in genere, di tipo biologico a fanghi attivi.

I fanghi attivi, o attivati, sono una sospensione in acqua di biomassa attiva (batteri saprofiti, protozoi, amebe, rotiferi e altri microrganismi), solitamente sotto forma di fiocchi. I reflui vengono sottoposti a un trattamento chimico con idrossido di calcio per regolarne il pH e con sali di ferro o alluminio per provocare la flocculazione di parte degli inquinanti.

Al fine di attivare lo sviluppo e la crescita di microrganismi responsabili dell'ossidazione delle sostanze organiche, si ricorre a vigorose areazioni, abbassando così il livello di “domanda biochimica di ossigeno” (BOD) dei liquami. Nelle vasche di aerazione, avviene il contatto fra la popolazione batterica e lo scarico da depurare, introdotto in continuità. La miscela areata, in uscita dalla vasca, viene inviata alle vasche di sedimentazione primaria, dove i fiocchi di fango attivo vengono separati dall'effluente che può essere scaricato, mentre il fango viene reintrodotta parzialmente nel sistema per mezzo di un circuito di ricircolo, e in parte viene estratto periodicamente come fango di esubero. Il risultato finale è l'eliminazione della sostanza organica biodegradabile, mediante trasformazione in materiale inerte e in una soluzione fangosa concentrata di sostanza organica, che deve essere sottoposta ad ulteriori trattamenti prima dello smaltimento. Un processo a fanghi attivi può ridurre più del 95 % del BOD di un refluo prodotto dall'industria agrumaria.

Alla fine sono presenti solo sostanze poco degradabili o sostanze fini che sfuggono alla seguente sedimentazione.

Normativa di riferimento

Le attività produttive dell'industria agrumaria richiedono e utilizzano una grande quantità di acqua.

L'acqua viene impiegata come ingrediente, come agente di sgrassatura, in processi di ebollizione e di raffreddamento, per il trasporto e il condizionamento di materie prime.

I reflui provenienti da impianti di lavorazione di agro-industrie sono caratterizzati da:

- ◇ Un elevato contenuto di sostanze organiche e biodegradabili, e di conseguenza da un'alta domanda di ossigeno;

- ◇ Elevato tenore di sostanze solide sospese, che pone il problema della loro separazione e dello smaltimento dei fanghi così prodotti.

La normativa italiana di riferimento per la tutela delle acque dall'inquinamento è il Decreto Legislativo n.152 del 3 aprile 2006, parte terza, sezione 2, recante "Norme in materia ambientale" (Testo unico ambientale), pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n. 88 del 14/04/2006, e recentemente modificato dal Decreto Legislativo n. 4 del 20/05/2008.

La norma, che recepisce la Direttiva 2000/60/CE, prevede le modalità generali che disciplinano il monitoraggio e la classificazione dello stato di qualità delle acque e un programma completo di tutela dei corpi idrici dall'inquinamento.

Il decreto recepisce tra l'altro, la Direttiva comunitaria 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane, che costituisce in quest'ambito la norma di riferimento per gli Stati membri della UE.

Secondo quanto previsto dal Decreto Legislativo n. 152/2006, con riferimento all'allegato 5 della parte terza, gli scarichi di acque reflue

industriali devono essere conformi ai limiti di emissione indicati nella successiva Tabella III o alle relative norme disposte dalle Regioni.

I valori limite di emissione che gli scarichi interessati non devono superare sono espressi, in linea di massima, in concentrazione. Tuttavia, le Regioni, nell'esercizio della loro autonomia in attuazione dei piani di tutela delle acque, tenendo conto dei carichi massimi ammissibili, delle migliori tecniche disponibili, definiscono i valori limite di emissione, diversi da quelli di cui alla Tabella III, sia in concentrazione massima ammissibile sia in quantità massima per unità di tempo (Kg/mese).

PARAMETRI	Unità di misura	Scarico in acque superficiali	Scarico in rete fognaria
pH		5,5 – 9,5	5,5 – 9,5
Colore		Non percettibile con diluizione 1:20	Non percettibile con diluizione 1:40
Odore		Non deve essere causa di molestie	Non deve essere causa di molestie
Materiali grossolani	mg/L	Assenti	Assenti
Solidi speciali totali	mg/L	≤ 80	≤ 200
BOD ₅ (come O ₂)	mg/L	≤ 40	≤ 250
COD (come O ₂)	mg/L	≤ 160	≤ 500
Ferro	mg/L	≤ 2	≤ 4
Rame	mg/L	≤ 0,1	≤ 0,4
Cloruri	mg/L	≤ 1200	≤ 1200
Solfati	mg/L	≤ 1000	≤ 1000
Azoto ammoniacale	mg/L	≤ 15	≤ 30
Azoto nitroso	mg/L	≤ 0,6	≤ 0,6
Azoto nitrico	mg/L	≤ 20	≤ 30
Grassi e oli animali/vegetali	mg/L	≤ 20	≤ 40
Idrocarburi totali	mg/L	≤ 5	≤ 10
Tensioattivi totali	mg/L	≤ 2	≤ 4
Pesticidi fosforati	mg/L	≤ 0,10	≤ 0,10
Pesticidi totali (esclusi i fosforati)	mg/L	≤ 0,05	≤ 0,05
Escherichia Coli	UFC/ 100 mL	Nota (*)	
Saggio di tossicità acuta (obbligatorio)		Il campione non è accettabile quando dopo 24 ore il numero degli organismi immobili è uguale o maggiore del 50 % del totale.	Il campione non è accettabile quando dopo 24 ore il numero degli organismi immobili è uguale o maggiore dell' 80 % del totale.

Tabella III. Valori limite di emissione in acque superficiali e in fognatura

Nell'allegato 8 della parte terza, viene riportato un elenco indicativo dei principali inquinati:

✓ Composti organoalogenati e sostanze che possano dare

origine a tali composti nell'ambiente acquatico;

- ✓ Composti organofosforici;

- ✓ Composti organostannici;

- ✓ Sostanze e preparati, o i relativi prodotti di decomposizione, di cui è dimostrata la cancerogenicità o mutagenicità e che possono avere ripercussione sulle funzioni steroidea, tiroidea, riproduttiva o su altre funzioni endocrine connesse nell'ambiente acquatico o attraverso di esso;

- ✓ Idrocarburi persistenti e sostanze organiche tossiche persistenti e bioaccumulabili;

- ✓ Cianuri;

- ✓ Metalli e relativi composti;

- ✓ Arsenico e relativi composti;

- ✓ Biocidi e prodotti fitosanitari;

- ✓ Materia in sospensione;

- ✓ Sostanze che contribuiscono all'eutrofizzazione (in particolare nitrati e fosfati);

- ✓ Sostanze che hanno effetti negativi sul bilancio dell'ossigeno (e che possono essere misurate con parametri come la BOD, COD, etc)

I valori limite dei contaminanti sono di tipo diverso a seconda dell'utilizzo che verrà fatto delle acque depurate e a seconda del tipo di corpo idrico in cui saranno riversati i reflui. In nessuna di queste tabelle sono riportati i parametri limite relativi ai terpeni. La presenza di queste molecole, i cui effetti sono ancora da comprendere, va quindi riportata alla voce "carbonio organico totale".

Il problema attualmente più pressante è quello di capire se essi costituiscono un pericolo per l'ambiente. Per riuscire a valutare la

pericolosità di una sostanza è però necessario conoscerne prima la modalità d'azione e, se occorre, sollecitare le autorità competenti sull'introduzione dei limiti relativi all'emissione di queste molecole.

Terpeni

I terpeni sono delle biomolecole costituite da multipli di unità isopreniche (Fig. 5) legate tra di loro testa-coda a formare strutture più o meno complesse che rappresentano il prodotto secondario del metabolismo delle piante.

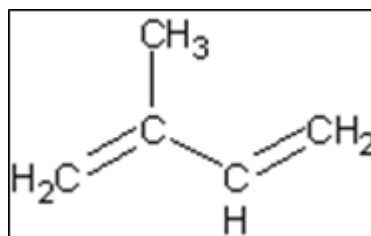


Figura 5 Unità Isoprenica

Il precursore comune di questi idrocarburi è il mevalonato che viene sintetizzato a partire dal glucosio di cui la quasi totalità è impiegata dalla pianta per la sintesi di acidi nucleici, peptidi e trigliceridi e una piccola parte è destinata alla sintesi di metaboliti secondari (Fig. 6).

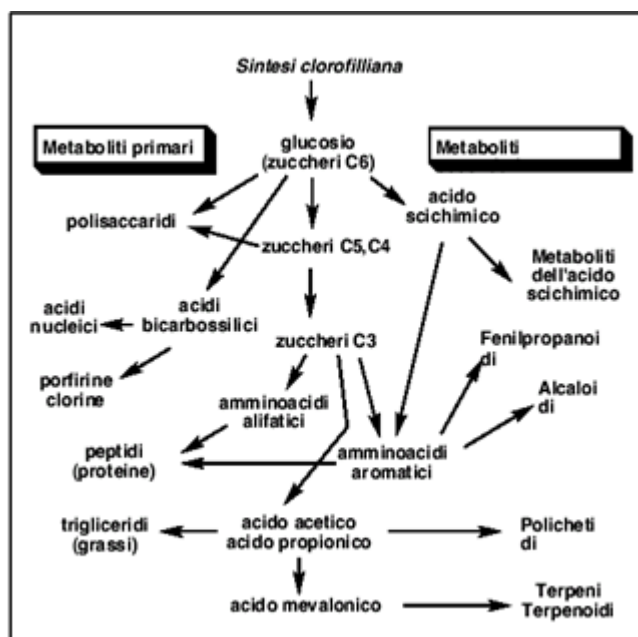


Figura 6. Origini dei terpeni nelle piante

Attraverso step successivi che implicano fosforilazione del

mevalonato, si giunge alla sintesi di isopentenil-5-pirofosfato (IPP), dell'isomero dimetilallil pirofosfato (DMAPP) e del precursore a dieci atomi di carbonio, il geranil pirofosfato (GPP), dal quale prendono origine tutti i terpeni. Questo carbocatione risultante può subire una serie di shift di idruri e riarrangiamenti che portano alla formazione di prodotti aciclici, ciclici e policiclici (Fig. 7) e all'acquisizione di gruppi funzionali contenenti atomi diversi dal carbonio, come gruppi idrossilici, carbonili o contenenti azoto che conferiscono il caratteristico odore alle piante aromatiche.

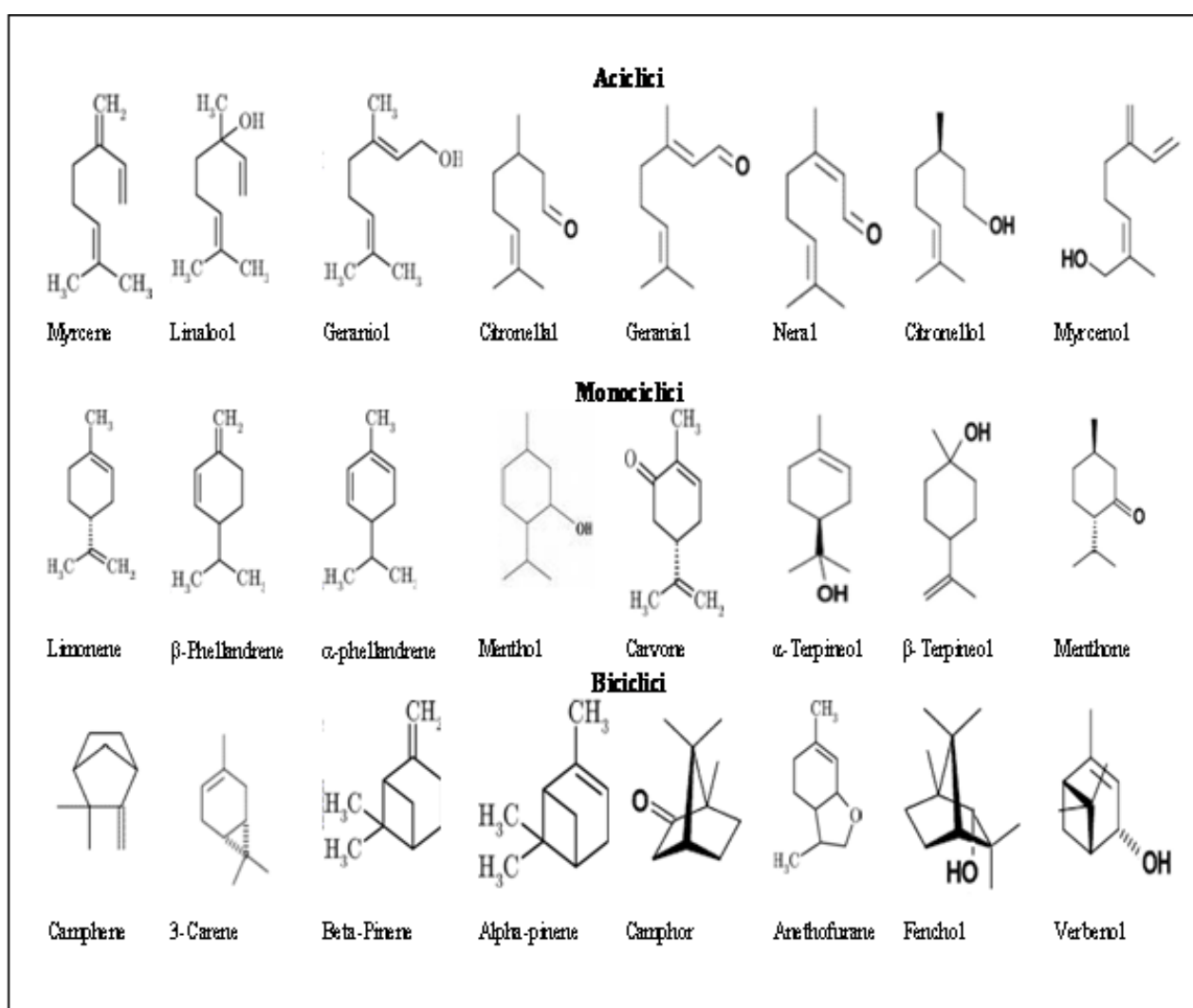


Figura 7. Alcuni esempi di monoterpeni

L'aroma tipico ed individuale delle piante è generato da miscele complesse dette oli essenziali (Fig. 8), i quali sono costituiti principalmente da monoterpeni e sesquiterpeni e dai loro derivati ossigenati.

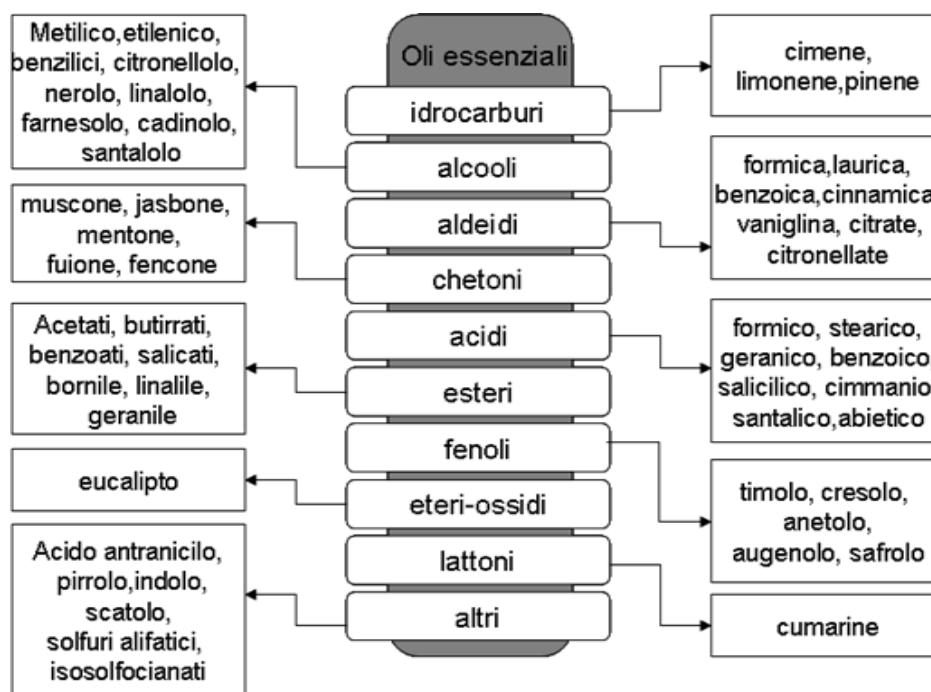


Figura8. Composizione degli oli essenziali

Il 90-95 % dei composti degli oli essenziali ha la caratteristica di essere volatile a temperatura ambiente (Fall, 1999).

Questi composti, detti VOCs (volatile organic compounds), possono partecipare, al pari di molte sostanze di natura antropica, alla catena di reazioni che determina la formazione e l'accumulo di ozono e molecole rilevanti sotto il profilo tossicologico (Lorenzini e Nali, 2005). In tempi recenti, queste evidenze hanno portato la comunità scientifica a focalizzare la propria attenzione su un nuovo (e in parte inquietante) fenomeno: le piante come “produttrici” di sostanze inquinanti.

Tutti i terpeni fanno parte dei composti organici volatili e nonostante la loro bassa solubilità in acqua, possono essere presenti, come sostanze inquinanti, anche nei corpi idrici. Un gruppo di ricerca guidato da Mohseni,

ha messo a punto un sistema di biofiltrazione per il trattamento di misture di composti idrofilici (metanolo) e idrofobici (α -pinene) prodotti nelle emissioni di alcune tipologie di industrie. I biofiltri sono costituiti da microrganismi adagiati su supporti di legno. I risultati di questo lavoro indicano che la biofiltrazione dà buoni risultati per ciò che riguarda la velocità di rimozione del metanolo, ma non per la velocità di rimozione del monoterpene (Mohseni e Grant, 2000; Mohseni e Allen, 1998) che perciò persistono nelle acque.

In natura, oli essenziali e terpeni svolgono un ruolo dinamico nelle strategie adattative a situazioni di sofferenza delle piante: hanno un effetto protettivo allo stress termico riducendo la denaturazione delle membrane esposte ad elevate temperature. Rivestono un ruolo nella repulsione di insetti fitofagi e patogeni in genere. Attraggono gli insetti impollinatori e riducono l'attrazione degli erbivori.

Sin dall'antichità le piante sono state impiegate dall'uomo per scopi diversi. Gli oli essenziali erano adoperati per la preparazione di profumi e saponi. Oggi, come in passato, con la differenza che l'industrializzazione moltiplica l'estrazione e la quantità utilizzate, le essenze trovano impiego nella cosmesi, nei prodotti medicinali e nell'alimentazione come additivi. L'odore infatti è considerato uno delle più importanti proprietà sensoriali che determina l'accettazione e la scelta del cibo da consumare (Guichard., 2006). Proprio per questo motivo, molti studi recenti si proiettano verso lo sviluppo di tecniche che possano migliorare la qualità sensoriale dei cibi. In Tunisia ad esempio Karoui e collaboratori (2010) hanno migliorato la natura organolettica dell'olio di semi di mais aggiungendo omogenati di bucce di agrume.

Dato il largo impiego di queste miscele è inevitabile l'interesse della comunità scientifica per valutarne gli effetti reali sull'ambiente e sulla

salute dell'uomo. Alcuni studi sono condotti valutando la miscela tutta, altri, anche se pochi, prendono in considerazione il singolo terpene.

È stato dimostrato ad esempio che molti oli essenziali, determinano danno mitocondriale, alterazioni alle membrane cellulari ed effetti citotossici, causati da cambiamenti del potenziale redox (Bakkalia et al, 2005); per questo motivo, alcuni oli essenziali sono usati come acaricidi (Lee et al., 2006), antifungini (Pyun, 2006) e antimicrobici). Un gruppo di ricerca dell'Università di Malta ha effettuato degli studi sull'olio essenziale estratto dalla conifera *Tetraclinis articulata*. I risultati ottenuti hanno evidenziato un effetto citotossico esplicito dai componenti di questi estratti su una varietà di cellule cancerogene e linfociti di sangue periferico. L'effetto tossico evidenziato è l'induzione dell'apoptosi (Buhagiar et al., 1999).

Altri studi hanno valutato la genotossicità di oli estratti da tre tipi di piante ricche di oli essenziali, *Anethum graveolens*, *Menta piperita* e *Pinus sylvestris*. Dai dati ottenuti, condotti in vitro su linfociti umani, sono emerse le capacità genotossiche di questi tre tipi di oli: la frequenza di alterazioni cromosomiche e di scambi tra cromatidi fratelli è maggiore quando le cellule sono trattate con l'olio estratto dai semi di *Anethum graveolens*. (Lazutka et al., 2001).

Il condensato estratto dal pino bianco è stato utilizzato da un gruppo di ricerca statunitense, per determinare sia il suo potenziale citotossico, attraverso il saggio di vitalità mediante il Trypan blue, l'indice mitotico e l'indice proliferativo, sia per valutare l'attività genotossica mediante la valutazione delle alterazioni cromosomiche e l'analisi degli scambi tra cromatidi fratelli (Singer et al., 1995; Mark et al., 1996). I risultati ottenuti mostrano che vi è sia una riduzione della vitalità cellulare, effetto citotossico, sia un aumento delle alterazioni cromosomiche e degli scambi

tra cromatidi fratelli, effetto genotossico, in accordo con i risultati precedentemente ottenuti dallo stesso gruppo mediante il test di Ames e le valutazioni sui linfociti umani. I linfociti di sangue periferico esposti al condensato di pino bianco mostrano, in assenza di attivazione metabolica, S9, un aumento dell'effetto citotossico e genotossico in maniera dose dipendente (Mark et al., 1995).

In questi anni, diversi gruppi di ricerca stanno compiendo interessanti studi sul possibile impiego di alcuni oli, o di componenti di essi, in campo oncologico. Infatti è stato osservato che alcune sostanze, derivanti dagli oli essenziali, possono avere un ruolo sia nella cura che nella prevenzione dei tumori. L'attività antitumorale si manifesta attraverso la regressione di tumori maligni preesistenti. Ad esempio sembra che il geraniolo, un monoterpene aciclico, abbia attività antitumorali in vivo in cellule di leucemia murina, epatoma e melanoma (Shoff et al., 1991; Yu et al., 1995). Un altro gruppo di ricerca che effettua studi sull'importanza della nutrizione nella chemioprevenzione, ha recentemente pubblicato un lavoro sul meccanismo d'azione del geraniolo nella riduzione di crescita del tumore del colon (Carnesecchi et al., 2001). Questi ultimi studi sono esempi di indagine sul singolo terpene. Ricerche di questo tipo in realtà sono pochi in letteratura.

E' noto che quasi tutti i monoterpeni determinano irritazioni agli occhi, alla pelle (Wei et al., 2006) e alle mucose, effetti infiammatori alle vie aeree superiori ed inferiori e sono responsabili di dermatiti da contatto, sia di tipo allergico che di tipo non allergico. Recentemente è stato, inoltre, dimostrato che il limonene ha un moderato effetto tossico acuto in ratti e topi, ed è documentato che l'esposizione a questo monoterpene provoca tumori renali nei ratti maschi (Rosenberg, 2002)

Di un altro terpene è ben documentata l'azione, il mentolo, principale

componente estratto dalla *Mentha piperita*, che è stato ampiamente usato in medicina nei raffreddori per decongestionare le vie aeree. Il mentolo, strutturalmente simile al limonene, è velocemente assorbito; studi su topi e ratti hanno evidenziato l'effetto tossico della presenza di questo terpene nella dieta, che si evidenziano con disturbi gastrointestinali. Recentemente sono state ritirate dal commercio le sigarette al mentolo perché è associato all'uso di questo tipo di sigarette un aumento della dipendenza alla nicotina che determina una maggiore inclinazione al fumo. Gli effetti di questo abuso si traducono in un aumento dei danni provocati soprattutto a livello polmonare (Garten e Falkner, 2004). Si sospetta inoltre che la combustione del mentolo, insieme alle migliaia di altre molecole presenti nel tabacco, possa determinare la formazione di composti reattivi in grado di aumentare l'incidenza dei tumori dell'apparato respiratorio. E' stato dimostrato che nella combustione delle sigarette al mentolo si sviluppano carcinogeni come il benzopirene, noto in letteratura per i suoi effetti (Sidney et al., 1995).

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione dei singoli terpeni nel loro ruolo antitumorale, è stato suggerito che possono interferire nell'interazione carcinogeno-DNA oppure possono influire sul metabolismo degli xenobiotici. Infatti è stato osservato che, allo stadio iniziale dei tumori mammari, il D-limonene così come altri terpeni, è in grado di indurre gli enzimi, di fase I e II, enzimi deputati al metabolismo di sostanze esogene come i carcinogeni; questo incremento di enzimi porta ad una più veloce detossificazione (Crowell, 1992). Viceversa l'effetto di soppressione del tumore che si manifesta in una fase successiva, potrebbe essere dovuto o all'induzione dell'apoptosi da parte dei terpeni, oppure all'inibizione della isoprenilazione di proteine che regolano la

proliferazione cellulare, in particolare delle proteine che legano il GDP¹, le laminine, Ras e le proteine ad essa associate. L'isoprenilazione consiste nell'aggiunta di una piccola molecola idrofobica alla estremità C-terminale della proteina; questa modifica post-traduzionale consente alla proteina di ancorarsi alla membrana citoplasmatica e quindi di prendere parte a tutti quei fenomeni correlati alla traduzione del segnale di proliferazione (Clarke, 1992; Kato et al., 1992)

¹ GDP-guanosin difosfato

L'alfa e il beta pinene

Il pinene ($C_{10}H_{16}$, 136,24 g/mol) è un monoterpene biciclico presente negli oli essenziali di diverse tipologie di piante, in modo particolare nelle conifere. Esistono due forme di isomeri strutturali, α e β entrambe hanno origine dal geranyl pirofosfato che è trasformato in un intermedio, il linaloil pirofosfato, da cui per successive ciclizzazioni si ottengono le due forme di pinene (Fig. 9).

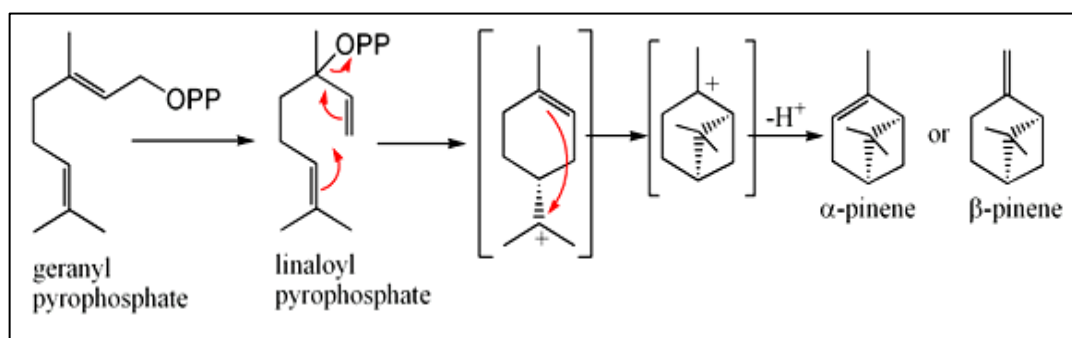


Figura.9. Biosintesi delle due forme di pinene.

Il D- limonene

Il limonene ($C_{10}H_{16}$, 136.24 g/mol) é un monoterpene monociclico particolarmente abbondante nell'olio essenziale estratto dalla buccia degli agrumi e nelle resine presenti nelle conifere (Chalet et al., 1977).

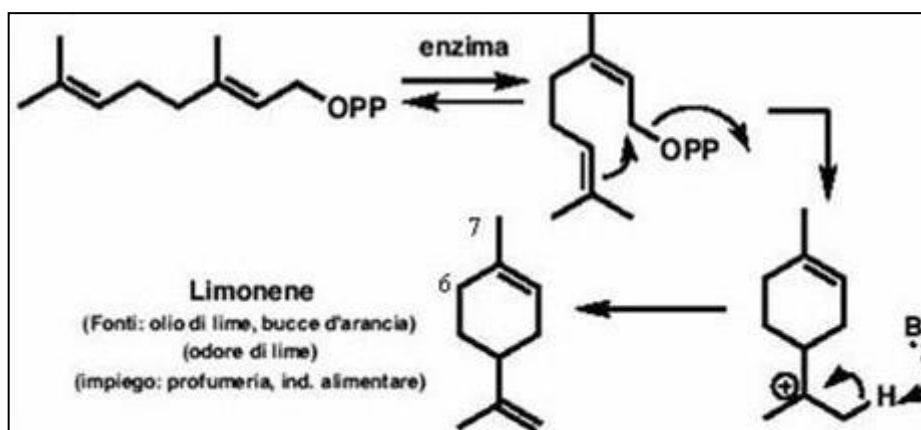


Figura 10. Biosintesi del D-limonene

Si forma per ciclizzazione del geranil pirofosfato (Fig. 10) in una reazione catalizzata dalla limonene sintetasi. Chimicamente esiste sotto forma di due isomeri ottici, D ed L. Non possiede gruppi chimici idrolizzabili in quanto sia il gruppo etilene che l'anello ciclico aromatico sono resistenti all'idrolisi.

Il delta 3-carene

Il Δ^3 -carene ($C_{10}H_{16}$, 136.24 g/mol) è un monoterpene biciclico e costituisce uno dei componenti della trementina. Non è solubile in acqua, ma miscibile con oli e grassi. Si forma a partire dal pinene (Fig. 11) ed è ubiquitariamente presente nelle piante aromatiche anche se in quantità minore rispetto all' α - β pinene e al D Limonene.

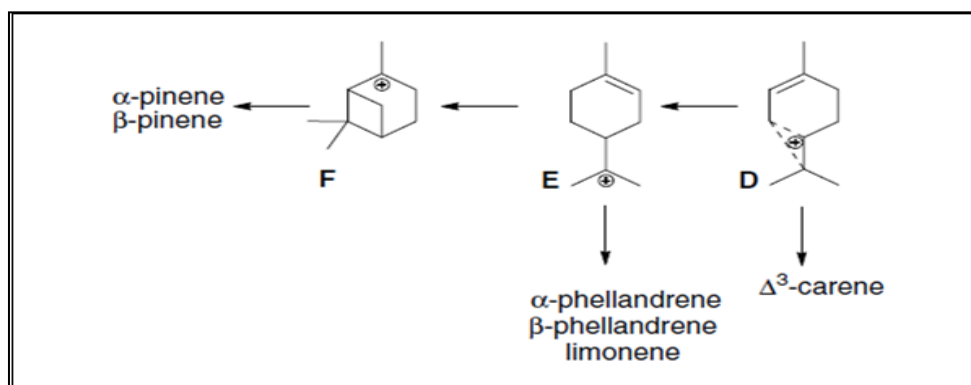


Figura 11. Biosintesi del Δ^3 -carene

Ha un odore dolce e pungente. Presente nell'essenza di arancia dolce, l'olio essenziale di questo agrume viene spesso utilizzato per sofisticare molti altri oli essenziali agrumari. E' noto che si trova in più abbondanza nel genere maschile delle piante (Roitman 2011).

Fotocatalisi Eterogenea

Il problema dell'inquinamento delle riserve di acqua potabile e dell'ambiente acquatico, unito alla scarsità delle risorse di acqua e, quindi, alla necessità del riutilizzo di questa, ha reso necessario ricercare processi di purificazione rapidi ed economici, capaci di assicurare la distruzione di composti inquinanti in maniera diversa e più efficiente delle tecniche tradizionali.

Alcuni dei metodi tradizionalmente adottati per la rimozione di inquinanti dalle acque sono: l'adsorbimento su carbone attivo, che non dà luogo ad una distruzione delle specie inquinanti ma soltanto ad un loro trasferimento di fase; l'ozonizzazione, che sfrutta le proprietà ossidanti dell'ozono, il quale ha una elevata reattività ma bassa solubilità in acqua; l'abbattimento biologico, che non è utilizzabile quando la velocità di accumulo delle acque da trattare supera in volume ed in carica organica la velocità delle degradazioni naturali; la sterilizzazione chimica, ovvero l'aggiunta di cloro, ipoclorito e simili, che generalmente lasciano tracce di sottoprodotti i quali possono risultare altamente tossici; il trattamento fisico, combinazione di molte operazioni quali filtrazione, flocculazione, osmosi inversa, che può non essere economicamente conveniente. Vi è inoltre, una classe di composti organici, nota come "composti organici bio-recalcitranti" (BROC), che non è biodegradabile. Molti dei più recenti processi di decontaminazione delle acque devono riguardare proprio l'ossidazione di questi composti.

Una tecnica che supera i limiti delle procedure tradizionali ed è capace di trasformare i composti BROC in specie biodegradabili è la fotocatalisi eterogenea, che negli ultimi 20 anni è stata proposta come una potenziale tecnica innovativa per la purificazione dell'aria e di effluenti acquosi (Ollis

1993; Schiavello et al 1997; Augugliaro et al., 1994- 1997).

La fotocatalisi è un metodo catalitico accoppiato a reazioni fotochimiche: un foto catalizzatore, per questo tipo di reazioni, esplica la sua azione quando irradiato con luce di opportuna lunghezza d'onda. Tale definizione ha come punti cardine il concetto di fotochimica e di fotocatalizzatore.

La fotochimica è una branca della chimica che si occupa delle reazioni indotte dall'interazione della luce con la materia. Si basa fondamentalmente su due leggi: la legge di Grotthus- Draper, secondo cui quando un fascio di luce incide sui reagenti, le lunghezze d'onda assorbite portano alla reazione chimica; e la legge di Stark –Einstein per cui ogni quanto di energia assorbita reagirà con una molecola.

Il fotocatalizzatore è un composto che ha la capacità di assorbire radiazioni elettromagnetiche di opportuna lunghezza d'onda e di trasformare l'energia derivante da essa in energia chimica. Le reazioni chimiche fotoindotte possono essere capaci di innescare la degradazione di sostanze organiche.

Alla base della fotocatalisi c'è la capacità di un semiconduttore di comportarsi come un sistema elettrochimico capace di dare origine a reazioni redox se sono presenti specie ossidabili o riducibili (Lohmann, 1967). Il comportamento dei semiconduttori, come dei conduttori ed isolanti, può essere illustrato in termini di modello a bande, in cui gli orbitali molecolari formati dall'assemblamento in un reticolo degli orbitali dei singoli atomi, sono talmente ravvicinati da dar luogo a bande di energia continua. Queste bande sono riempite da elettroni posizionati in ordine crescente di energia: la banda interna completamente o parzialmente occupata è chiamata di valenza (VB), quella più esterna formata dagli orbitali antileganti vuoti è chiamata banda di conduzione (CB). Le bande sono separate da una regione chiamata

regione energetica proibita o “band gap”. Quando le due bande sono vicine o sovrapposte, l’energia necessaria all’elettrone per saltare da una banda ad un’altra è bassa e il solido sarà un conduttore. Nel caso in cui le due bande hanno energia molto differente, l’elettrone necessita di un apporto elevato di energia per superare il “band gap” e il solido sarà un isolante. I materiali con un band gap compreso tra quello dei conduttori e quello degli isolanti sono i semiconduttori. Un semiconduttore assorbe un fotone, con un’energia uguale o superiore a quella di band gap e un elettrone passa dalla banda di valenza a quella di conduzione dove si crea una lacuna di carica o “buca” positiva. In questo caso il solido presenta una piccola conducibilità elettrica dovuta al movimento di cariche negative e di quelle positive che si comportano come particelle positive, indicate come h^+ , anch’esse in grado di migrare (Fig. 12). Inoltre la conducibilità è possibile solo se una banda non è completamente piena; l’elettrone infatti per muoversi, deve essere eccitato ad un livello appena superiore: se non ci sono livelli liberi esso non può spostarsi.

La conducibilità di un semiconduttore può essere aumentata mediante l’aggiunta di atomi estranei nel reticolo cristallino (drogaggio) che rendono disponibili elettroni nella banda di conduzione o buche nella banda di valenza. Quando si aggiungono al reticolo atomi capaci di donare elettroni, il livello di Fermi (E_f), ovvero il livello energetico per il quale esiste il 50% di probabilità di trovarvi un elettrone, si sposta verso la banda di conduzione (Fig. 13 b); nel caso in cui gli atomi aggiunti sono capaci di accettare elettroni e corrispondentemente creare delle

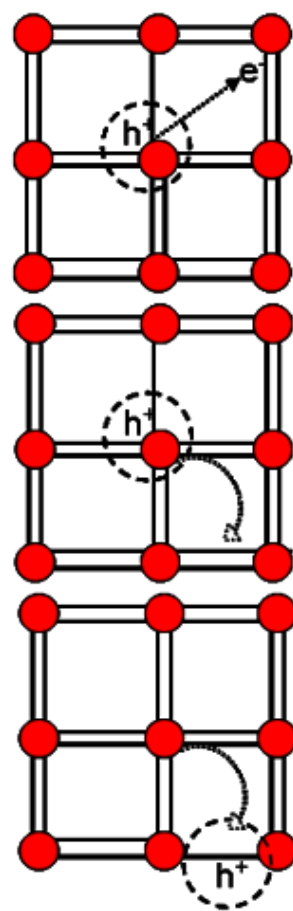


Figura 12.
*Migrazione delle
lacune*

buche nella banda di valenza il livello di Fermi si muove verso la banda di valenza (Fig. 13 c). Nel primo caso si parlerà di semiconduttore estrinseco di tipo “n” e nel secondo caso estrinseco di semiconduttori di tipo “p”. Un semiconduttore capace di condurre cariche senza l’aggiunta di atomi estranei è detto semiconduttore intrinseco (Fig. 13 a).

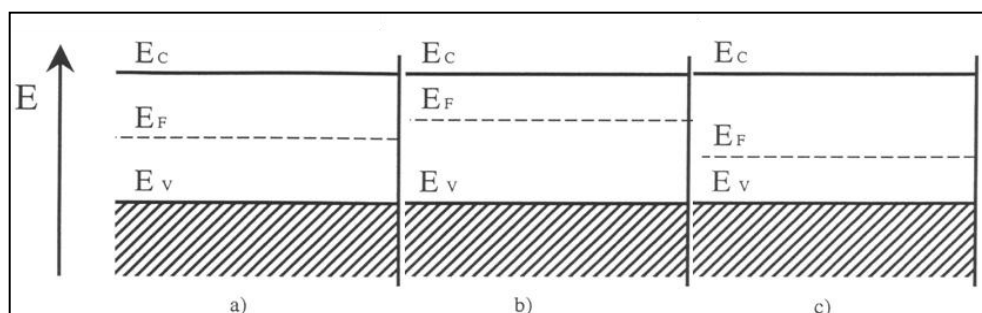


Figura 13. Distribuzione dei livelli energetici di un semiconduttore: a) intrinseco, b) di tipo n, c) di tipo p.

L’elettrone e la buca possono ricombinarsi sulla superficie, o nel “bulk” della particella, e possono essere intrappolati in siti superficiali dove possono reagire con specie donatrici o accettrici di elettroni, ossidandole o riducendole. L’elettrone e la buca, infatti, possiedono una energia potenziale che in certi casi può essere ceduta a delle coppie redox che hanno un potenziale più negativo di quello della VB (le buche possono fungere da ossidanti) o più positivo di quello della CB (gli elettroni fotoprodotti possono fungere da riducenti) (Fig. 14). Spesso i semiconduttori vengono impiegati in soluzioni come sospensioni di polveri; ogni particella si comporta come una piccola fotocella mobile e indipendente da tutte le altre presenti in soluzione. Ciascuna di queste strutture elementari rappresenta una particella illuminata che in un sistema fotocatalitico funziona come una cella fotoelettrochimica costituita da un elettrodo semiconduttore in contatto con un contro elettrodo costituito da metallo inerte (Bard, 1980).

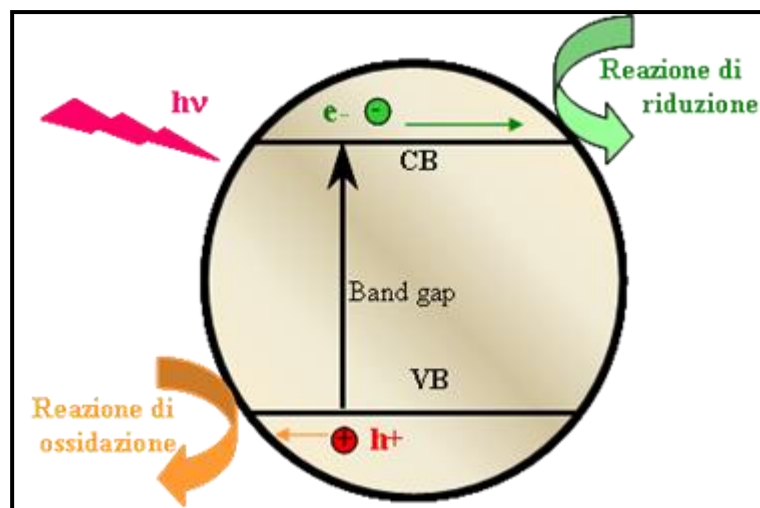


Figura. 14 Schema del processo fotocatalitico che avviene su una particella illuminata a contatto con un sistema redox

Mentre in una cella elettrochimica sull'elettrodo semiconduttore avviene la reazione di ossidazione o di riduzione, su ogni particella di semiconduttore immersa in un elettrolita, entrambe le reazioni avvengono simultaneamente per trasferimento di buche dalla banda di valenza e per cessione di elettroni dalla banda di conduzione. Di conseguenza, quando si illuminano sospensioni acquose di polvere cristallina di un semiconduttore avviene contemporaneamente l'attivazione di un numero elevatissimo di "fotocelle" che attivano la formazione di specie reattive capaci di innescare la degradazione di molte sostanze organiche inquinanti, riducendole, nella loro forma meno pericolosa per l'ambiente e determinando l'eliminazione di ioni inorganici.

Idealmente un semiconduttore usato come catalizzatore deve essere chimicamente e biologicamente inerte, fotocataliticamente attivo, facile da produrre ed usare, poco costoso ed attivabile dalla luce solare, biologicamente inerte. Inoltre, requisito primario per la degradazione dei composti organici è che il potenziale redox della coppia $\text{H}_2\text{O}/\cdot\text{OH}$ ($\text{OH}^- - \text{OH} + e^-$, $E^\circ = -2,8 \text{ V}$) sia contenuto all'interno del "band-gap" del semiconduttore. Diversi semiconduttori hanno un'energia del "band-gap"

sufficiente per funzionare come catalizzatori in una vasta gamma di reazioni chimiche di interesse ambientale. Fra questi troviamo: TiO_2 (anatasio) ($E_g = 3,2 \text{ eV}$), WO_3 ($E_g = 2,8 \text{ eV}$), SrTiO_3 ($E_g = 3,2 \text{ eV}$), Fe_2O_3 ($E_g = 3,1 \text{ eV}$), ZnO ($E_g = 3,2 \text{ eV}$), ZnS ($E_g = 3,6 \text{ eV}$).

I semiconduttori maggiormente utilizzati nella fotocatalisi eterogenea sono l'ossido di Zinco (ZnO), il triossido di tungsteno (WO_3) e il biossido di titanio(TiO_2). Molti studi vengono condotti utilizzando in parallelo più di un catalizzatore, allo scopo di valutare quale sia il più efficiente nel processo di fotocatalisi. Ad esempio, a parità di condizioni chimiche e fisiche quali concentrazione dei catalizzatori, temperatura e pH, è stato dimostrato come in acque agro-industriali, la cinetica di degradazione di pesticidi organofosfati, sia determinata dal tipo di catalizzatore. Il TiO_2 rispetto allo ZnO , con l'aggiunta di perossidi, degrada e mineralizza del tutto il dimetoato (composto organofosfato) (Evgenidou et al., 2005).

Il semiconduttore che rappresenta il miglior compromesso fra le prestazioni catalitiche e la stabilità in mezzo acquoso, compreso l'atossicità nei confronti dell'ambiente e sulla salute umana è il diossido di Titanio.

Il titanio è il nono elemento per abbondanza nella crosta terrestre, ed è presente in molte rocce ignee e nei sedimenti da esse derivate. Non si trova libero in natura e questo influisce nei costi di estrazione. Nella sua forma ossidata invece è disponibile in grande quantità, e per le sue caratteristiche fisiche e chimiche trova applicazioni in molte attività industriali. Ad esempio viene adoperato nelle vernici, nella carta, nei cementi e nelle plastiche poiché si presenta come una polvere bianca, permanente e con buone capacità coprenti; per l'eccellente resistenza, capacità di sopportare temperature estreme, le leghe vengono utilizzate nell'industria aeronautica e aereospaziali; per la sua alta biocompatibilità è utilizzato anche per protesi mediche. Il biossido di titanio è una polvere cristallina che in natura si

presenta sotto tre forme: brookite, rutilo, e anatasio. Le ultime due forme sono quelle maggiormente utilizzate: ciascun atomo di titanio è circondato ottaedricamente da sei atomi ossigeno; la cella elementare del cristallo è formata da due tetraedri che nel caso del rutilo sono legati da uno spigolo, mentre nell'anatasio da un vertice (Fig. 15).

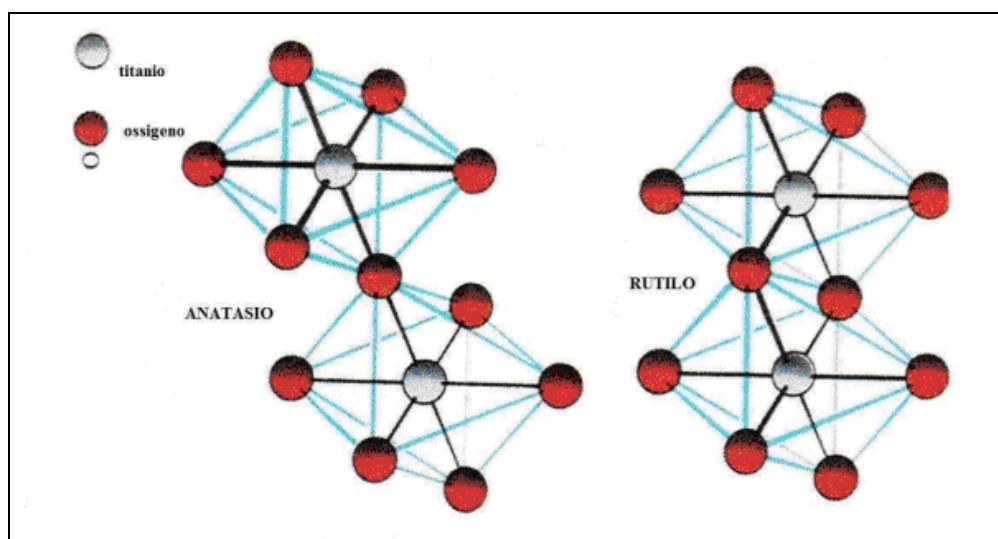


Figura 15. Struttura spaziale dell'anatasio e del rutilo

Questa diversità spaziale dei due tipi di cristalli fa del rutilo un cristallo utilizzabile come pigmenti nella colorazione, e dell'anatasio una struttura policristallina più adatta alla fotocatalisi. Però, entrambi i cristalli possono essere utilizzati come fotocatalizzatori, poiché nella prima tappa del processo di fotodegradazione l'energia necessaria per superare il "band gap" per rutilo è di 3,0 eV, contro i 3,2 eV necessari all'anatasio. Tuttavia l'anatasio mostra un'attività fotocatalitica più elevata nel corso della reazione, dovuta alla posizione della sua banda di conduzione che mostra un potere riducente più forte rispetto a quello del rutilo (Li Puma et al., 2008); è la forma più stabile alle basse temperature e può essere preparato in forma di polvere ad alta area superficiale. Inoltre, la scarsa efficienza del rutilo legata all'alta velocità di ricombinazione delle coppie buca-elettrone e alla sua bassa capacità di foto

assorbire l'ossigeno (Scalisi et al., 1990) lascia propendere per l'utilizzo l'altra forma di TiO_2 . Per riscaldamento a temperature elevate, che possono andare dai 300 agli 800 °C si ha la transizione dell'anatasio a rutilo. Piccole quantità di rutilo sembrano influenzare positivamente la foto attività; infatti il più usato TiO_2 commerciale è il Degussa P25, costituito da una miscela di anatasio (75%) e rutilo (25%): Bickley e collaboratori hanno visto che la struttura anatasio/rutilo del P25 promuove la separazione delle cariche fotogenerate ed inibisce la loro ricombinazione. Catalizzatori commerciali diversi dal P25, per lunghezza d'onda assorbita, rapporto delle fasi cristalline dei diversi tipi di TiO_2 e grandezza delle particelle, sono utilizzate per la fotocatalisi, e paragonati tra di loro nell'efficacia di degradazione di particolari sostanze (Tab. IV). E' stato mostrato ad esempio come, nella degradazione di pesticidi quale 2-4 diclorofenolo ed erbicida come 2,4,5-triclorofenolo e bromacile (Singh et al., 2003-2007) l'ordine dell'efficacia di degradazione sia la seguente: P25 > UV100 > PC500 > TTP.

Specification and characteristics of TiO_2 samples.

Sample	Specific surface area BET (m^2/g)	Crystal size (nm)	Composition	Ref.
P25	50	21	75% Anatase, 25% Rutile	Singh et al., 2007b
PC500	287	5–10	100% Anatase	Singh et al., 2007b
UV100	250	5	100% Anatase	Singh et al., 2007b
TTP	9.82	N/A	N/A	Singh et al., 2007b
PC 10	10	65–75	100% Anatase	Erquez and Pichat, 2006
PC 50	54	20–30	100% Anatase	Erquez and Pichat, 2006
Rhodia	150	N/A	100% Anatase	Erquez and Pichat, 2006

Tabella IV. Lavori comparativi sui diversi di fotocatalizzatori (Admed S et al, 2008)

Le proprietà del TiO_2 come semiconduttore sono dovute a difetti nella sua composizione stechiometrica che costituiscono una sorta di drogaggio interno; infatti, la sua composizione reale è, TiO_{2-x} e l'eccesso di ioni Ti (IV) viene bilanciato da un eccesso di elettroni che gli conferiscono il

comportamento da semiconduttore di tipo “n” Il TiO_2 , inoltre, ha un potenziale redox che gli permette di ossidare una vasta gamma di composti organici, compresi i composti organici clorurati, come la diossina, in composti non nocivi (CO_2 e H_2O) (Dohshi et al., 2001). Il TiO_2 è un catalizzatore eterogeneo che appartiene alla famiglia dei catalizzatori bifunzionali acido-base. Questo tipo di catalizzatori hanno sulla loro superficie attiva dei centri superficiali che conferiscono loro contemporaneamente un’attività di tipo acido e basico sufficientemente forte. La presenza sia di centri acidi che basici ha una notevole influenza sull’interazione superficiale substrato-catalizzatore. In presenza di O_2 e H_2O si generano specie radicaliche molto reattive che possono reagire con molecole organiche degradandole (Fig. 16).

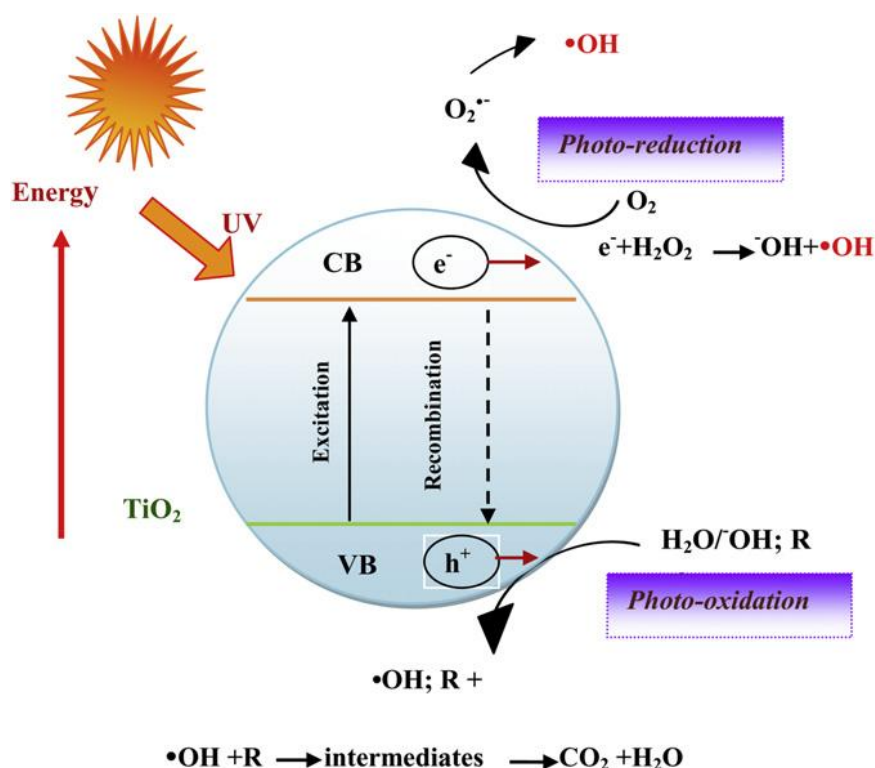


Figura 16. Esempificazione reazioni fotocatalitiche

La performance della fotocatalisi dipende molto anche dalla fonte di irradiazione che si utilizza. Le fonti di radiazioni maggiormente usate sono: la lampada ad arco, che è un dispositivo in cui si genera un arco voltaico

quando, dopo un iniziale contatto tra gli elettrodi questi vengono allontanati l'uno dall'altro. L'arco di luce generato è nel campo degli UV. Il secondo tipo di lampada è quello a fluorescenza in cui la superficie della lampada è coperta da un involucro di metallo e di sali di fosforo; il catodo è costituito da tungsteno ed ha una bassa emissione termo-ionica capace di amplificare l'emissione di elettroni quando attraversato dalla corrente. Più complesse sono la lampada LASER (ligh amplification by stimulated emission of radiation) e la lampada LED (ligh emitting Diodes). Il primo sistema di lampada è basato sull'amplificazione della luce che, incanalata in un sistema di specchi rimbalza avanti e indietro, e cresce in intensità. Nella lampada LED invece a muoversi è la coppia elettrone-buca, verso diodi ricoperti da semiconduttori drogati. La lunghezza d'onda ottenuta è quella vicina alla regione degli UV, con lunghezza d'onda intorno a 350-370 nm. Infine è la luce solare (la cui lunghezza d'onda va da 200 a 5000 nm) una fonte di luce molto adoperata in fotocatalisi eterogenea e può trovare impiego in sistemi di larga scala. Nelle linee generali, all'aumento dell'intensità della luce corrisponde un incremento della velocità e dell'efficienza della degradazione fotocatalitica. Dal punto di vista economico proprio "la lampada" rappresenta il punto debole della metodologia fotocatalitica su ampia scala, dati gli alti costi dell'energia elettrica. La convenienza risulta indubbia però se si utilizzano reattori solari. Oltre il problema del costo dell'energia, bisogna tenere presente che il metodo fotocatalitico non permette di risolvere indiscriminatamente tutti i problemi derivanti dall'inquinamento ambientale. Esso non può essere utilizzato nel caso di fanghi che, sporcando il catalizzatore, potrebbero impedirne il funzionamento; nel caso in cui il catalizzatore è in forma sospesa vi è il problema della sua separazione; inoltre, la fotocatalisi non può essere utilizzata per soluzioni molto concentrate. Quest'ultimo punto è molto studiato, nella prospettiva di allargare la metodologia della fotocatalisi a sistemi di purificazione

industriali e urbani: la fotodegradazione è alta quando le concentrazioni delle sostanze sono basse, e bassa quando le concentrazioni sono alte. Inoltre la formazione di intermedi di degradazione che possono essere adsorbiti sulla superficie del catalizzatore comporta una de-attivazione dei siti attivi del TiO_2 e una riduzione del livello totale di degradazione. L'alternativa immediata per ovviare a questo problema potrebbe essere quella di aumentare la quantità del catalizzatore, ma questa risulta una strada poco percorribile, per il semplice fatto che troppo catalizzatore disperso in soluzione acquosa potrebbe agglomerarsi e aumentare la torbidità della soluzione, riducendo l'effetto fotolitico indotto dalla luce (Kaneco et al., 2009; Bahenemann et al., 2007). Ad esempio, per acque provenienti da industrie di colorazione di tessuti, le quali presentano un alto carico di sostanze non biodegradabili, la fotocatalisi sarebbe efficiente utilizzando grosse quantità di catalizzatore. In questi casi il TiO_2 diventerebbe un inquinante secondario del percorso di degradazione. Per ovviare a questo problema il TiO_2 può essere immobilizzato su superficie di polimero resistente agli UV. I risultati mostrano capacità di degradazione, misurata in termini di COD (chimica oxygen demand) e riduzione di tossicità dei coloranti acidi delle acque reflue

Nel corso degli ultimi anni la ricerca si è indirizzata verso la fotochimica dei semiconduttori nanoparticellari, atomi o molecole le cui dimensioni variano fra 1 e 100 nm. In una particella di dimensioni nanometriche, vi è una elevata percentuale di atomi sulla superficie, il che vuol dire maggiori possibilità di trasferimento di carica.

Tali studi si sono estesi e spinti al punto che l'utilizzo di nano-particelle in diversi ambiti delle attività umane, dalla costruzione di superfici di strutture edili alla chemioterapia, nell'ultimo ventennio (Fig. 17) ha condotto la branca della scienza che si occupava di eco-tossicità a spostarsi su un

terreno così specifico da ridefinirsi di nano-ecotossicità. Tramite indagini chimiche di soluzioni acquose e di effetti su organismi quali crostacei, alghe, batteri e lieviti si è valutata la dose LD 50 (concentrazione necessaria per provocare il 50% di morte) di diverse nano particelle come TiO_2 , ZnO , CuO e nano Ag. (Tab. V) (Kahru et al., 2010). Questi studi hanno mostrato come il TiO_2 abbia un valore di LD 50 molto più alto degli altri composti inorganici a testimoniare la sua scarsa pericolosità.

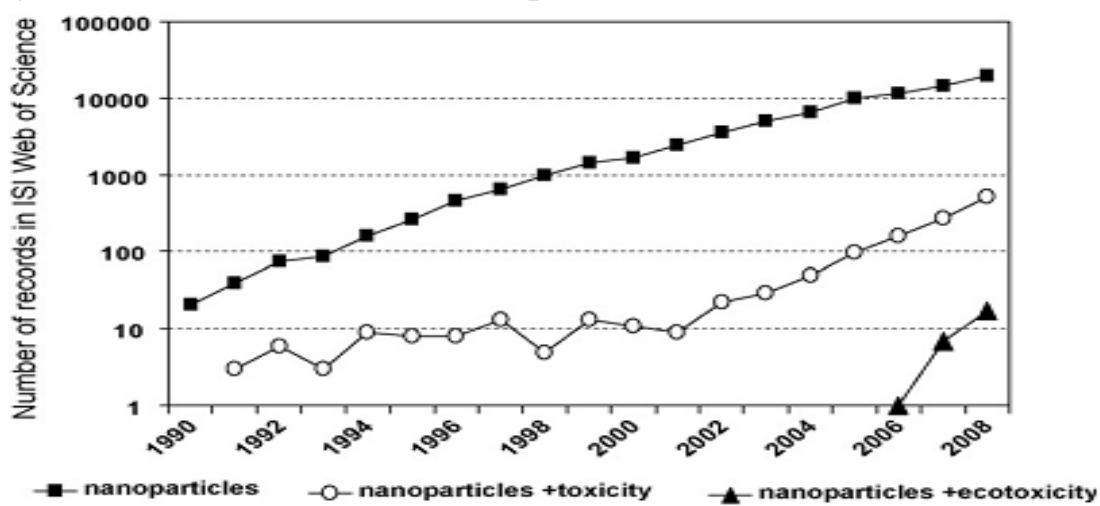


Figura. 17 Number of records in ISI Web of Science of Thomson Scientific. 2009

Inoltre, lo ZnO risulta genotossico e citotossico oltre che sui sistemi cellulari utilizzati come bioindicatori come ad esempio i batteri *Streptococcus agalactiae* e i pesce zebra *Danio rerio*, anche sui linfociti umani, in cui induce danni al DNA tradotti nella formazione di rotture cromosomiche, multinucleate e apoptosi cellulare (Yin e Casey, 2010).

Trattamento di cheratinociti con TiO_2 e ZnO indica che il primo non ha alcun effetto sulla vitalità cellulare neppure a concentrazioni superiori ai 100 $\mu\text{g/mL}$, mentre il secondo riduce la vitalità cellulare già a concentrazione di 10 $\mu\text{g/mL}$ (Kocbek et al., 2010)

Group of organisms	Inorganic nanoparticles			
	mg TiO ₂ /l Nano TiO ₂	mg ZnO/l Nano ZnO	mg CuO/l Nano CuO	mg Ag/l Nano Ag
Crustaceans	67.7 (10)	0.62 (3)	2.65 (2)	0.040 (1)
Bacteria	603 (4)	20 (3)	71 (2)	7.60 (5)
Algae	65.5 (4)	0.068 (2)	0.87 (1)	0.23 (2)
Fish	300 (4)	1.9 (2)	NF	7.1 (1)
Ciliates	NF	5.4 (1)	156.5 (1)	39.0 (1)
Nematodes	80.1 (1)	2.24 (1)	NF	NF
Yeasts	20000 (1)	121.2 (1)	20.5 (1)	NF
No. of data	24	13	7	10
Lowest L(E)C50	65.5	0.068	0.87	0.040
Most sensitive organisms	Algae	Algae	Algae	Crustaceans
Classification (1-7) ^b	Harmful	Extremely toxic	Very toxic	Extremely toxic
Classification (1-3) ^c	Harmful	Extremely toxic	Very toxic	Extremely toxic

Tabella V. Confronto LD 50 di nanoparticelle su diversi organismi (Kahru A. et al 2010)

Con i dovuti accorgimenti e con l'adeguamento del metodo da caso a caso, la fotocatalisi risulta essere efficiente per la degradazione di moltissimi composti, organici e non, artificiali e naturali rilasciati nell'ambiente.

Le applicazioni in laboratorio trovano conferme e successi. Tuttavia c'è ancora la necessità di determinare un utilizzo pratico di questa tecnica su scala commerciale.

Materiali e metodi

Campionamenti

I campionamenti di reflui sono stati eseguiti in due aziende di trasformazione degli agrumi della provincia di Palermo. Sono stati scelti tre punti di campionamento da cui prelevare le acque da analizzare: le vasche di lavaggio delle agrumi (acque di lavaggio-A); le vasche in cui vengono raccolte, prima di essere immesse nel depuratore, tutte le acque prodotte dal processo di lavorazione degli agrumi (acque in entrata-B); le vasche in cui sono raccolte le acque in uscita dal depuratore (acque in uscita-C) (Fig 18).

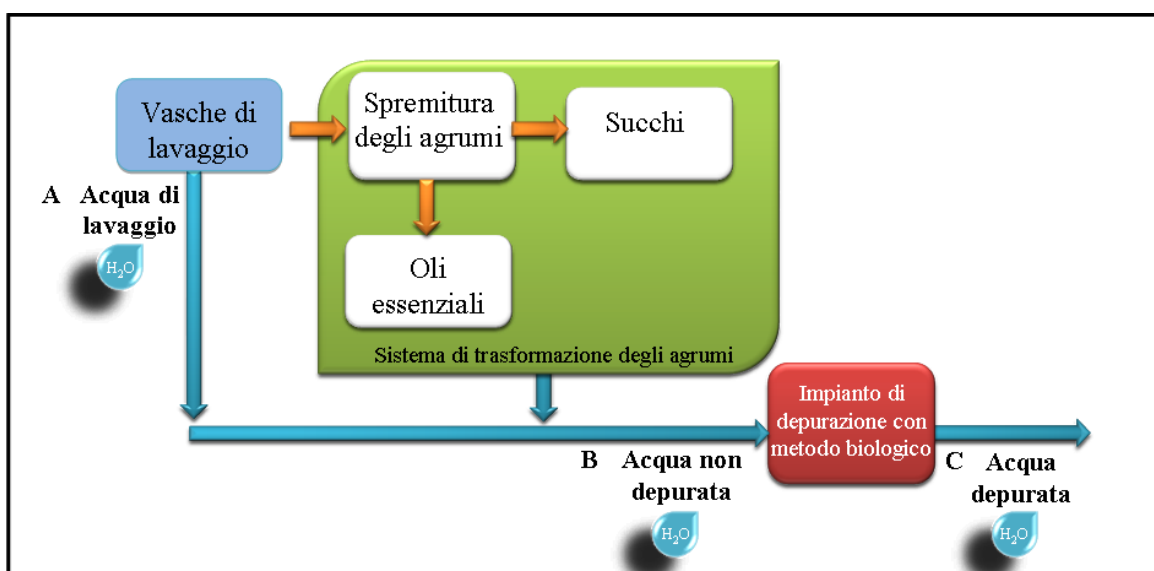


Figura 18. Schema dell'industria di trasformazione degli agrumi

Per ogni punto di campionamento 110 ml di acqua reflua sono stati conservati in bottiglie da 125ml di vetro scuro, sigillate con tappi in politetrafluoroetilen (PTFE)/silicone e conservate a 4°C fino al momento delle analisi.

SPME

I monoterpeni sono stati estratti dai campioni di acqua mediante Micro Extraction Solid Phase (SPME). Gli standard sono stati preparati dissolvendo i singoli monoterpeni (Extrasynthese) in etanolo (HPLC grade, Carlo Erba) e quindi in acqua ultrapura (Millipore water purification system Milli-Q) al

fine di ottenere le concentrazioni desiderate.

Le bottiglie contenenti i campioni di acqua raccolte nei diversi punti di prelievo, sono poste in un bagnetto termostato a 50°C. Per l'adsorbimento (fase di estrazione) è stata usata una fibra PDMS di 85µm introdotta attraverso il tappo, per un tempo complessivo di 10 minuti. Le molecole così adsorbite sono desorbite introducendo la fibra nell'iniettore del gas cromatografo a 250°C (splitless mode: 2 minuti).

I campioni sono stati analizzati sia in Gas-cromatografia tradizionale con un GC/FID Shimadzu 2010-A che in GC/MS Shimadzu QP2010 accoppiando in questo caso uno spettrometro di massa di tipo quadrupolare come rivelatore al posto del FID.

La metodica col GC/FID Shimadzu prevedeva le condizioni, elencate in tabella VI.

Temperatura iniettore	250°C
Tempo di desorbimento	2 minuti in splitless
Modalità di controllo del flusso	Velocità lineare: 25,9 cm/sec
Pressione in colonna	87,1 KPa
Flusso totale	6,7 ml/min
Flusso in colonna	1 ml/min
Purge flow	0,7 ml/min
Temperatura colonna	60°C

Tabella VI parametri del GC/FID Shimadzu

Il programma termico, mostrato in figura 19, prevedeva un'isoterma iniziale di 3 minuti a 60°C, continuava con un incremento di 15°C al minuto fino a 130°C e con un incremento di 30°C al minuto fino a 240°C, e

terminava con un'isoterma finale di 1 minuto a 240°C. Il tempo di analisi era di 12 minuti e 33 secondi.

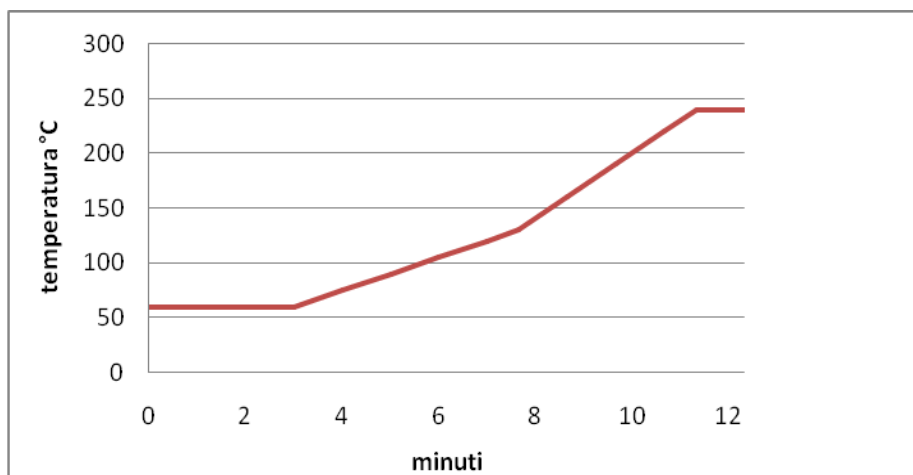


Figura .19. Rampa delle temperature GC/FID

La metodica col GC/MS Shimadzu prevedeva le condizioni indicate in tabella VII.

Temperatura iniettore	250°C
Tempo di desorbimento	2 minuti in splitless
Pressione in colonna	11,4 KPa
Modalità di controllo del flusso	Velocità lineare: 25,9 cm/sec
Flusso totale	3,7 mL/min
Flusso in colonna	0,50 mL/min
Purge flow	0,7 mL/min
Interfaccia	230°C
Ionizzazione	EI (+)
Intervallo di massa	39-400 dalton

Tabella. VII. Parametri GC/MS Shimadzu

La programmata termica era identica a quella prevista nell'analisi con il GC/FID Shimadzu.

La registrazione degli spettri è stata fatta in full scan con una velocità di scansione di 0,5 secondi.

In entrambe le strumentazioni, la fibra è stata fatta desorbire nell'iniettore a 250°C e per rendere le analisi facilmente comparabili, la separazione è stata eseguita usando due colonne identiche come dimensioni e come fase stazionarie. Si tratta di una colonna Supelcowax (Supelco) in carbowax, lunga 30 metri, con un diametro interno di 0,25 mm e spessore del film di rivestimento di 0,25 µm.

TEST DI AMES

Culture batteriche

Terreno liquido

I batteri (ceppi TA100), ottenuti per striscio da piastre master o da stock congelati a -80°C , sono fatti crescere in brodo nutriente (Nutrient Broth Oxoid n° 2), con aggiunta di 100 μl di ampicillina (0,5%). Le colture sono poste in agitatore a 37°C ed al buio per circa 4-6 ore. Quando i batteri hanno raggiunto la fase di crescita esponenziale, che corrisponde a 10^9 cellule/ml, si procede all'esecuzione del test di Ames o al loro congelamento.

La concentrazione batterica ottimale (10^9 cellule/ml), valutata mediante uno spettrofotometro utilizzando una lunghezza d'onda di 650 nm, è corrispondente ad un valore di assorbanza compreso tra 0,56 e 0,6.

Piastre terreno nutriente

In una beuta sono sciolti in 800 ml di acqua bidistillata, 12 g di agar e 20 g di nutrient broth oxoid. Il tutto è autoclavato a 121°C per 20 minuti. Una quantità stabilita di agar (circa 30 ml) viene versata nelle piastre. Le piastre coperte, capovolte sono messe in camera calda o in incubatore a 37°C per farle asciugare tutta la notte. Queste piastre vengono utilizzate per il controllo dei marcatori dei ceppi (mutazione locus rfa, uvrB), per la valutazione della vitalità cellulare e per l'allestimento di piastre master da cui ricavare, per striscio, colture fresche.

Piastre terreno minimo

In una beuta sono sciolti 15 g di agar in 930 ml di acqua bidistillata. e autoclavati a 121°C per 20 minuti. Quando l'agar ha raggiunto la temperatura di 65°C sono aggiunti 50 ml di glucosio 40% e 18 ml di

soluzione VBS 50X precedentemente sterilizzati. Infine circa 30 ml di agar vengono versati in piastre per colture batteriche che vengono conservate a temperatura ambiente

Soluzione VBS (50x)

In una beuta con 670 ml di acqua a 45°C sono sciolti in ordine:

10 g di solfato di magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$).

100 g di acido citrico monoidrato.

500 g di fosfato di potassio dibasico anidro (K_2HPO_4).

175 g di sodio ammonio fosfato ($\text{NaH}_2\text{NH}_4\text{PO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$).

Il tutto è stato sterilizzato con 5ml di cloroformio.

Soluzione di glucosio (40%)

40 g di glucosio sono sciolti in 100 ml di acqua bidistillata. La soluzione di glucosio è poi stata autoclavata a 113°C per 20 minuti.

Soluzione Biotina-istidina 0,5 mM

In 100 ml di acqua calda sono sciolti 12,21 mg di biotina (Calbiochem). A questa soluzione si aggiungono 10,48 mg di istidina. La soluzione è sterilizzata con filtri da 0,22 μm .

Soluzione di ampicillina

0,5 g di ampicillina sono sciolti in 100 ml di acqua bidistillata.

Generalmente non è necessario sterilizzare, eventualmente possono

essere usati filtri da 0,22 μm .

Top agar

Il top agar si ottiene sciogliendo in una beuta 6 g di agar e 6 g di NaCl in 1 l d'acqua. Si autoclava a 121°C per 20 minuti. Dopo la sterilizzazione, quando l'agar raggiunge i 45°C si aggiungono 10 ml di una soluzione 0,5 mM di istidina-biotina per ogni 100 ml di top agar. Questa quantità di istidina, consentendo ai batteri di eseguire qualche ciclo di replicazione, permette di individuare quei mutageni che svolgono la loro attività solo durante questa fase del ciclo cellulare.

Procedimento test di Ames

Per il test di mutagenesi sono impiegate piastre di terreno minimo agarizzato. Queste piastre sono state preparate almeno un giorno prima. Sono state utilizzate diverse dosi di terpene e per ogni dose analizzata, per la coltura non trattata (controllo), e per la coltura trattata con il solvente (DMSO 0,05%), sono state allestite almeno 3 piastre.

In 2 ml di top agar, dispensato in tubi 13 x 100 mm conservati a 45°C, sono stati aggiunti 108 batteri in crescita esponenziale e non più di 150 μl della sostanza che si vuole saggiare, alla concentrazione desiderata; dopo una rapida agitazione il contenuto del tubo è versato sulle piastre di terreno minimo. Appena il top agar si è solidificato, le piastre sono capovolte e poste a 37°C per 2 giorni, tempo necessario per la visualizzazione delle colonie di revertanti.

Tutte le piastre sono osservate allo stereomicroscopio per l'identificazione delle colonie di Salmonella; inoltre alcune colonie, selezionate a caso dalle piastre dei controlli e dei trattati, vengono strisciate

su piastre di terreno selettivo (Hektoen enteric agar, Biogenetics) e incubate a 37°C per 24 h, altre sono sottoposte ad agglutinazione mediante un antisiero specifico per Salmonelle (Statens Serum institut).

Linea cellulare e reagenti chimici

In questi studi è stata utilizzata la linea cellulare V79, fibroblasti di tessuto polmonare embrionale di Hamster cinese, ottenuta in seguito a proliferazione in vitro. Le cellule hanno un tempo di duplicazione di circa 12-13 h ed il loro cariotipo è a 21 cromosomi come precedentemente dimostrato (Sciandrello et al., 1996). La linea V79 è mantenuta in coltura in terreno minimo D-MEM (Gibco Invitrogen), arricchito con siero bovino fetale 5% (Gibco Invitrogen) e con una miscela di antibiotici ed antimicotici 1% (Gibco Invitrogen). Le cellule sono mantenute in un incubatore a CO₂ (5%) alla temperatura di 37°C .

L'α-pinene, il D-limonene, β-pinene e Δ³-carene (Sigma-Aldrich) sono preparati immediatamente prima dell' utilizzo diluiti in terreno completo e DMSO 0,5 % (Aldrich).

Saggio di esclusione del Trypan blue

3×10^5 cellule sono state impiantate in piastre da 60 mm. Dopo 18 h, le cellule sono trattate con la sostanza in esame. Allo scadere del tempo di trattamento le cellule sono ripetutamente sciacquate con HSS (Hank's Salt Solution, Sigma), tripsinizzate e risospese in terreno fresco. Ad un'aliquota di questa sospensione (100 μ l) è aggiunto il Trypan-blue in proporzione 1:1. Dopo 2 min, tempo necessario per la colorazione, si procede alla conta delle cellule vitali (non colorate) e delle cellule non vitali (colorate) con la camera di Burker. La vitalità cellulare è espressa come percentuale di cellule vitali sul numero totale di cellule contate.

Saggio clonogenico

Una coltura in crescita esponenziale di V79 è stata staccata dal substrato mediante una soluzione di tripsina 1 X (Biochrom) e 300 cellule sono state piastrate in multiwells. Per ciascuna dose saggiata e per il controllo sono state allestite 3 piastre. A 18 h dall'impianto è stato aggiunto il singolo terpene e la miscela. Trascorso il tempo di esposizione e allontanato i monoterpeni, le cellule sono lavate con HSS (Hank's Salt Solution), quindi lasciate crescere in terreno fresco per 10 giorni. Al termine di questo periodo le cellule sono colorate con blu di metilene (0,1%). Sono state contate le colonie visibili ad occhio nudo ed in ogni caso formate da più di 50 cellule. Dal numero di colonie si ricava l'efficienza di clonaggio relativa data dal rapporto tra il numero percentuale di colonie nelle colture trattate e quello ottenuto nelle colonie non trattate.

I trattamenti sono stati ripetuti almeno tre volte. I dati sono presentati come \pm SD (deviazione standard).

Comet assay

Una coltura in crescita esponenziale di cellule V79 è tripsinizzata e circa 10^6 cellule sono piastrate in capsule petri da 100 mm. Dopo 18 h le cellule vengono trattate. Alla fine del periodo di trattamento si eseguono 2 sciacqui con HSS (Hank's Salt Solution); quindi le cellule sono staccate con tripsina e risospese delicatamente con terreno fresco. La sospensione cellulare è quindi posta in tubi falcon e centrifugata a 800 rpm per 10 min. Terminata la centrifugazione, si aggiunge alle cellule PBS (Sigma) per avere una concentrazione di 200.000/10 μ l. Le cellule così risospese sono mantenute in ghiaccio. Per la preparazione dei vetrini, 100 μ l di Normal Melting Agarosio (NMA Fisher Molecular Biology) (0,5% agarosio in PBS) sono stratificati sul lato idrofilico del gel bond mediante un coprioggetto. Si lascia solidificare a 4°C per 5 min. Sullo strato di NMA si pipettano quindi 75 μ l di Low Melting Agarosio (LMA, Bio-Rad) (0,7% agarosio in PBS) contenenti la sospensione di cellule (2×10^5 /10 μ l di PBS). Si lascia solidificare a 4°C per 5 min. Infine si aggiungono 65 μ l di LMA che si lasciano solidificare a 4°C per 5 min.

I gels bond sono sottoposti a lisi lasciandoli 1 h o tutta la notte a 4°C nel tampone di lisi (Na_2EDTA 100 mM, NaCl 2,5 M, Tris 10 mM, 10% DMSO, 1% Triton X-100, pH 10,0). Terminata la lisi, i gels bond sono lavati con una soluzione denaturante (NaOH 300 mM, Na_2EDTA 1mM, pH > 8) 2 volte per 2 min quindi sono posti nella cella elettroforetica riempita con la stessa soluzione denaturante per 20 min.

Al termine di questo periodo si esegue la corsa elettroforetica a 300 mA per 20 min a 4°C al buio. Dopo la corsa, i gels bond sono lavati 3 volte con soluzione rinaturante (Tris HCl 0,4 M, pH 7,5) per 5 min a 37°C. Infine i preparati sono fissati con metanolo a -20°C per 3 min e colorati con Bromuro di Etidio (2 μ g/ml Electran BDH) e quindi esaminati al microscopio a

fluorescenza (NiKon Microphot-FXA/SA).

Per ogni trattamento si esegue una valutazione qualitativa su 1000 nuclei ed una quantitativa su 50 nuclei (da due diversi vetrini) mediante un sistema di analisi delle immagini, denominato CASP (Comet Assay Software Project). L'analisi quantitativa fornisce tre parametri:

- Tail length*** (lunghezza della coda) che misura la lunghezza della coda sottoposta a migrazione.

- Tail DNA*** che misura la percentuale di fluorescenza nella coda.

- Tail moment*** (TM - momento della coda) che è il prodotto della lunghezza della coda per l'intensità di fluorescenza della coda.

Il danno al DNA, nelle cellule trattate e non trattate, è stato quantificato dai valori del Tail lenght (L Tail) e dal Tail moment (TM).

Test per la selezione dei mutanti 6TG resistenti

Cellule di V79 sono state esposte a trattamenti per un ora ai singoli terpeni e ai combinati; subito dopo il trattamento sono state tripsinizzate e contate. Da ciascuna coltura sono state allestite:

- a) tre piastre da 60 mm con 3×10^2 cellule per la valutazione della sopravvivenza;
- b) dieci piastre da 100 mm con 5×10^5 cellule alle quali dopo circa 2 ore si aggiungono 30 $\mu\text{g/ml}$ di 6-tioguanina (TG - Sigma) per la selezione dei mutanti T_0 ;
- c) tre piastre con 5×10^5 cellule lasciate crescere in terreno completo senza droga (mantenimento).

Dopo 72 ore le piastre c) vengono tripsinizzate e le cellule riseminate in modo tale da allestire piastre del tipo a) e b) per selezionare i mutanti T_{72} e c). Dopo altre 72 ore si ripete l'operazione per selezionare i mutanti a 6 giorni dal trattamento (T_{144}).

Otto giorni dopo la semina delle cellule, alle piastre a) si aggiungono poche gocce di una soluzione alcolica di blu di metilene (0,1%) per 30 min a temperatura ambiente. Dopo un risciacquo si procede alla conta delle colonie. Le colonie cresciute nelle piastre b) vengono colorate e contate 15 gg. dopo la semina.

La frequenza dei mutanti è data dal numero di colonie cresciute nel mezzo selettivo diviso il numero di cellule vitali seminate. Osservata la presenza di eventuali mutanti (ogni cellula mutante genera una colonia visibile) è calcolata la frequenza di mutazione m (numero di mutanti per milione di cellule) con la seguente equazione:

$$m = (10^6 \times M) / e.c \times C$$

Nell'equazione, M è il numero totale dei mutanti, C è il numero totale di cellule seminate, ed $e.c.$ è l'efficienza di clonaggio.

Sono condotti tre indipendenti trattamenti e i dati sono presentati come media \pm SD (deviazione standard).

Analisi statistica

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistiche non parametriche e parametriche sulla base dall'andamento della distribuzione degli eventi.

I dati acquisiti con il Comet Assay, sono stati analizzati con test non parametrici per la loro distribuzione non normale. In particolare sono stati utilizzati i seguenti test:

- il Kruskal-Wallis, che è il test non parametrico per l'analisi della varianza;
- il Mann-Whitney (U-test), che è l'analogo non parametrico del t di student per distribuzioni non normali.

Tutti i dati ottenuti dagli altri test sono stati statisticamente avvalorati dell'analisi della varianza (One.Way Anova) e dal T di Student (One Sample T Test e Independent-Sample T Test).

Le analisi statistiche sono state eseguite con il programma specifico l'SPSS (Statistical Package for Social Science).

Fotocatalisi

La fotocatalisi eterogenea è stata applicata a soluzioni sintetiche dei quattro terpeni e ad acque reflue reali campionate nelle industrie di trasformazione degli agrumi.

I quattro terpeni sono stati utilizzati ad una concentrazione di 8,4 mg/ l ($6,16 \times 10^{-5}$ M) ovvero quantità tre ordini di grandezza maggiore rispetto quantità rilevate nei reflui reali. Gli esperimenti di degradazione fotocatalitica sono stati effettuati in un fotoreattore chiuso ermeticamente, il cui volume è 280 ml, contenente 100 ml di soluzione acquosa e 0,4 gr/l di TiO_2 Degussa P25 policristallino (ca. 80% anatasio, 20% rutilo). Prima di iniziare l'irradiazione, la sospensione è stata agitata meccanicamente per 30 minuti allo scopo di disperdere-sospendere il fotocatalizzatore e di far raggiungere un equilibrio di adsorbimento - desorbimento del sistema terpeni-fotocatalizzatore. La sorgente di radiazione utilizzata è stata una lampada a media pressione di vapori di mercurio con una potenza di 400 W (Helios Italquartz) posta esternamente al fotoreattore, a 20 cm dalla sospensione. Un filtro di acqua situato tra la lampada e il fotoreattore mantiene la temperatura all'interno del reattore a circa 300 K. Il flusso fotonico ($1,5 \text{ centimetri mW}^{-2}$), che raggiunge la sospensione, è stato misurato con un radiometro UVX Digital.

I terpeni in fase gassosa presenti nello spazio di testa del reattore sono stati prelevati (200 μ l), analizzati utilizzando un cromatografo gassoso Shimadzu GC-17A equipaggiato con un AT Alltech -1 (30 m \times 0,53 millimetri ID) e una colonna FID al fine di monitorarne l'evoluzione della degradazione durante la prova.

Contemporaneamente la quantità di CO_2 derivante dalla completa

ossidazione di carbonio presente nel substrato è stato monitorato per tutta utilizzando un gas cromatografo HP6890 dotato di una colonna e un Carboxen TCD.

Per lo studio della cinetica di fotodegradazione dei reflui reali è stato utilizzato un fotoreattore discontinuo in Pyrex, di forma cilindrica e volume di 1,5 l, munito di un numero di ingressi ed uscite per garantire l'immissione di ossigeno e la liberazione di biossido di carbonio prodotto. I reflui reali, prima di essere utilizzati sono stati diluiti 1:50 per ovviare i problemi di torbidità del campione.

Il sistema si compone anche di una lampada a media pressione di vapori di mercurio da 500 W (Helios Italquartz) ad immersione, disposta coassialmente rispetto al reattore. La lampada è provvista di una doppia camicia, interna ed esterna, in Pyrex, entro cui circola acqua per garantirne il raffreddamento.

Il sistema reagente, durante le prove, è mantenuto in condizioni di saturazione di ossigeno e in continua miscelazione. La figura 20 mostra lo schema del sistema di reazione usato.

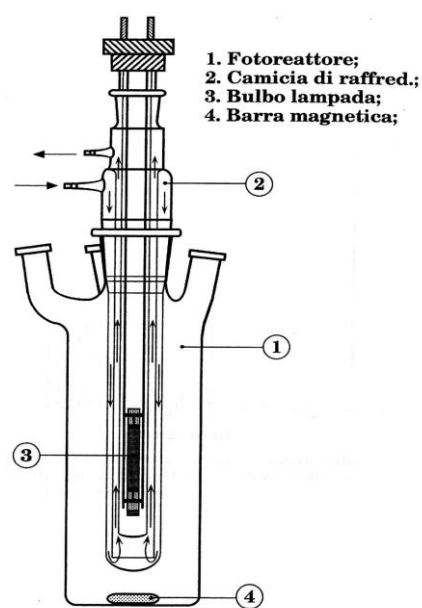


Figura. 20. Schema di un fotoreattore catalitico

La degradazione fotocatalitica dei reflui è stata seguita tramite misurazione del carbonio organico totale (TOC) tramite un analizzatore Shimadzu ASI 5000 A.

T.O.C: Analizzatore di Carbonio Organico Totale

Il carbonio organico è stato rilevato attraverso un analizzatore T.O.C Shimadzu 5000 A provvisto dell'autocampionamento ASI 5000 A.

L'apparecchio misura la quantità di carbonio totale (TC), di carbonio inorganico (IC), e di carbonio organico totale (TOC= TC-IC) presenti in soluzioni acquose. Lo strumento consta di seguenti componenti:

- ✓ Sistema di iniezione
- ✓ Sistema di reazione per lo sviluppo di CO₂
- ✓ Rivelatore
- ✓ Componenti ausiliari
- ✓ Sistema di controllo, acquisizione ed elaborazione dei dati

Il funzionamento si basa sulla seguente procedura: i campioni da analizzare, vengono posti nell'autocampionatore, addizionati con acido cloridrico 2 M e, successivamente, sottoposti ad insufflaggio di aria cromatografica (con un contenuto blando di biossido di carbonio) al fine di allontanare il carbonio inorganico presente in soluzione.

Dopo 4 minuti viene prelevato un volume noto di campione ed inviato al reattore di combustione provvisto di un catalizzatore di ossidazione mantenuto alla temperatura di 680 °C.

Il gas di trasporto (aria cromatografica), opportunamente inumidito con un umidificatore, viene inviato al reattore di combustione con una velocità di flusso di 150 ml/min.

Successivamente il campione, grazie ad un iniettore, raggiunge il gas di trasporto nel reattore di combustione: la componente organica brucia e si

decomporre fino a convertirsi in CO₂.

L'aria cromatografica trascina il prodotto di combustione al di fuori del reattore facendolo fluire in un recipiente di reazione per essere raffreddato ed asciugato da un deumidificatore.

Il flusso di gas dopo essere passato attraverso una trappola per alogeni giunge alla cella campione di un rilevatore infrarosso non dispersivo che rileva il contenuto di CO₂ presente nel gas stesso.

Dal rilevatore parte un segnale analogico che genera un picco la cui area, opportunamente determinata da un integratore, è proporzionale alla concentrazione del TOC presente nel campione.

Risultati e Discussione

Tipologie e concentrazione dei terpeni riscontrati nei reflui mediante SPME

Uno degli obiettivi di questo progetto di ricerca è stato l'identificazione e la quantificazione di quattro monoterpeni (α -pinene, β -pinene, Δ 3-carene, D-limonene) nei reflui reali derivanti dalle industrie di trasformazione degli agrumi.

Pertanto la prima tappa di lavoro è stata quella di individuare un metodo analitico che fosse in grado di semplificare la preparazione del campione riducendo al minimo la manipolazione dello stesso, e di raggiungere una sensibilità analitica appropriata, utilizzando una strumentazione standard, al fine di stimare l'impatto ambientale di questo tipo di industria e di valutare l'efficienza del processo di bonifica dei reflui.

L'estrazione con solvente, la distillazione in corrente di vapore e la Solid Phase Microextraction (SPME), sono le metodiche più comunemente utilizzate per l'isolamento dei terpeni (Hamm et al., 2003; Flamini et al., 2007; Vicki et al., 2006) e dei composti volatili in generale, presenti nei prodotti agrumari.

Rispetto ad altre tecniche, la SPME (Vas e Vekey 2004) offre diversi vantaggi nella preparazione dei campioni. È un metodo che non richiede l'uso di solventi (solvent free), in cui l'estrazione e la preconcentrazione dell'analita avvengono in un unico step, fornendo estratti privi di possibili interferenti. Il metodo è stato introdotto nel 1989 da Janusz Pawliszyn, e ha reso possibile l'estrazione di sostanze volatili e semi-volatili da varie matrici solide, liquide o gassose (di origine ambientale, biologica e alimentare). La SPME viene usata in combinazione con la Gas-Cromatografia, l'HPLC, l'elettroforesi capillare e le sue performance di sensibilità sono ulteriormente incrementate con accoppiamento con la spettroscopia di massa.

In collaborazione col Laboratorio di Spettroscopia di Massa del Dipartimento STEMBIO dell'Università degli Studi di Palermo è stato possibile eseguire l'SPME/FID e GC sui campioni in esami.

L'estrazione degli analiti in SPME, può essere effettuata o immergendo direttamente la fibra nel campione liquido, DIRECT-SPME (sistema a due fasi), oppure esponendo la fibra nello spazio di testa del campione, cioè nella fase vapore sovrastante il campione, HEAD SPACE-SPME (sistema a tre fasi). Sono state impiegate entrambe le metodiche per l'analisi dei terpeni e la tecnica di estrazione HS-SPME, seguita da analisi GC/FID, ha mostrato una maggiore sensibilità rispetto all'introduzione diretta (immersione) per tutte le sostanze analizzate come si può osservare nella figura 21.

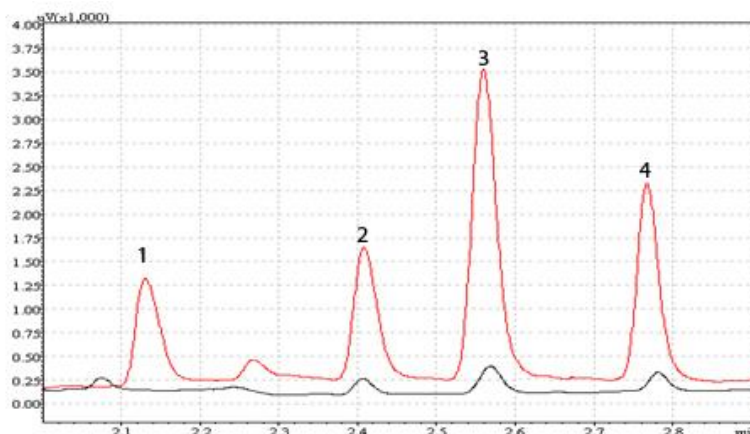


Figura 21. Cromatogrammi degli analiti α -pinene(1), β -pinene (2), Δ^3 -carene (3), D-limonene (4), ottenuti per Direct-SPME (nero) e dopo HS-SPME (rosso).

La formazione della fase vapore sovrastante i campioni è stata ottenuta dopo averli posti a bagno a 40°C per 30 minuti, tempo necessario per determinare la saturazione dello spazio di testa. L'estrazione è stata fatta con una fibra in PoliDimetilSilossano (PDMS) 100 μ m, esposta alla fase vapore per 10 minuti.

Il tempo di estrazione è stato opportunamente scelto dopo aver verificato che la fibra veniva saturata a un tempo di adsorbimento di 30 minuti ad alte concentrazioni, mentre esponendo

la fibra per 10 minuti si otteneva una buona linearità in un ampio intervallo di concentrazione (Fig. 22).

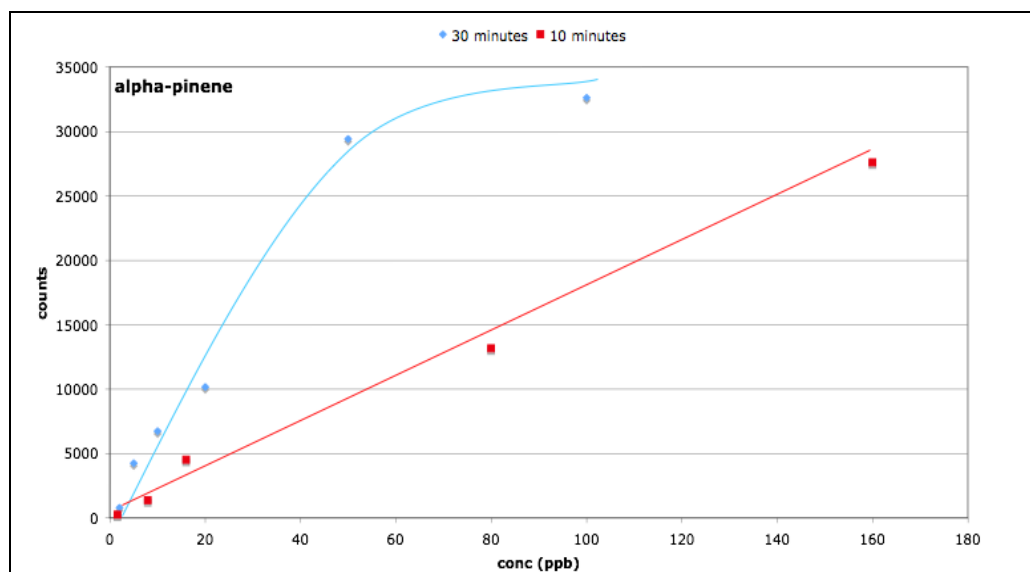


Figura.22. confronto dell'andamento della concentrazione (ppb) dell' α -pinene a tempi di esposizione diversi della fibra (30 minuti e 10 minuti).

Per la scelta della fibra più idonea all'estrazione delle sostanze dalla matrice acquosa, sono state confrontate tre fibre con rivestimenti diversi, ma tutte adeguate all'adsorbimento di sostanze altamente volatili.

Le prove sono state effettuate con le seguenti fibre:

- Monofasica, 100 μm PoliDimetilSilossano (PDMS-100 μm);
- Bifasica, Carboxen/PoliDimetilSilossano (Carboxen/PDMS 85 μm);
- Trifasica, DivinilBenzene/PoliDimetilSilossano/Carboxen (DVB/PDMS/Carboxen 50/30 μm).

La fibra monofasica PDMS 100 μm , è la fibra che offre la maggiore capacità di estrarre dallo spazio di testa gli analiti presi in esame.

I campioni sono stati analizzati in Gas-cromatografia tradizionale con un GC/FID Shimadzu 2010-A.

Poiché i monoterpeni sono scarsamente solubili in acqua ($\approx 10\text{-}30$ mg/L) (Ojala, 1999), per l'analisi qualitativa e quantitativa, sono state

preparate preventivamente soluzioni etanoliche madri dei quattro terpeni, usando come standard i seguenti reagenti : α -(+)-pinene, β -(-)-pinene, Δ^3 -carene, D-limonene.

L'analisi GC/FID della miscela degli standard solubilizzati in acqua Millipore a concentrazione pari a 150 ppb ha fornito il cromatogramma in figura 23, con i picchi relativi agli analiti.

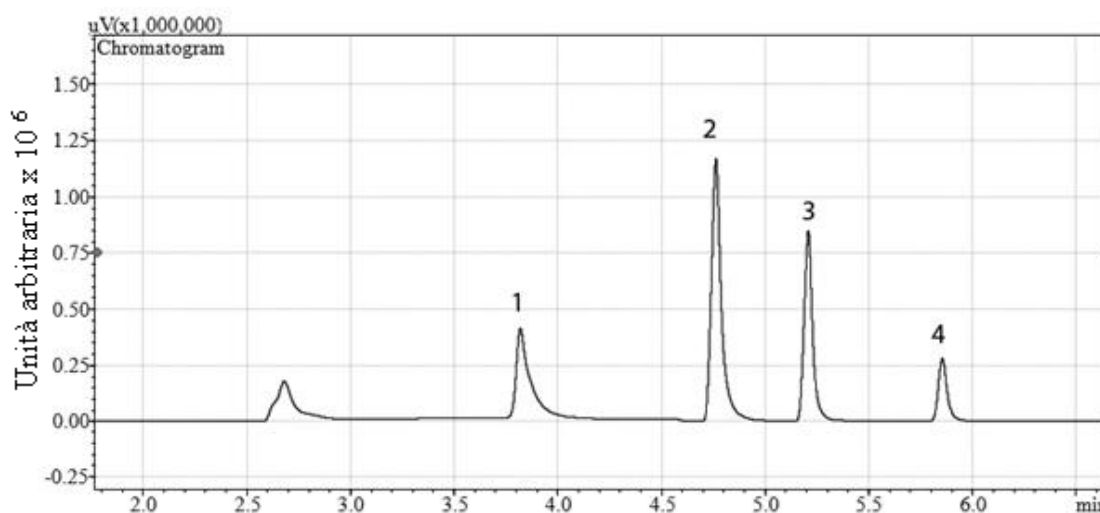


Figura 23. α -pinene (1), β -pinene (2), Δ^3 -carene (3), D limonene (4).

Per ciascuno dei monoterpeni in esame sono state costruite le curve di calibrazione mediante le analisi HS-SPME- GC/FID sulle soluzioni standard dei quattro analiti.

Sono stati considerati cinque valori di concentrazione, espressi in ppb ($\mu\text{g/L}$), e ciascun valore riportato nella curva è il risultato della media di tre analisi.

Per ogni standard dei quattro monoterpeni, sono state considerate concentrazioni crescenti corrispondenti a: 5, 10, 50, 150 e 500 ppb.

Solo per l' α -pinene è stato considerato un ulteriore valore di concentrazione pari a 1000 ppb in quanto questo analita era presente nei campioni reali sempre a concentrazioni maggiori rispetto agli altri tre.

I punti sperimentali sono stati diagrammati ed è stato eseguito un

“fitting”, ottenendo le curve di taratura riportate nella figura 24.

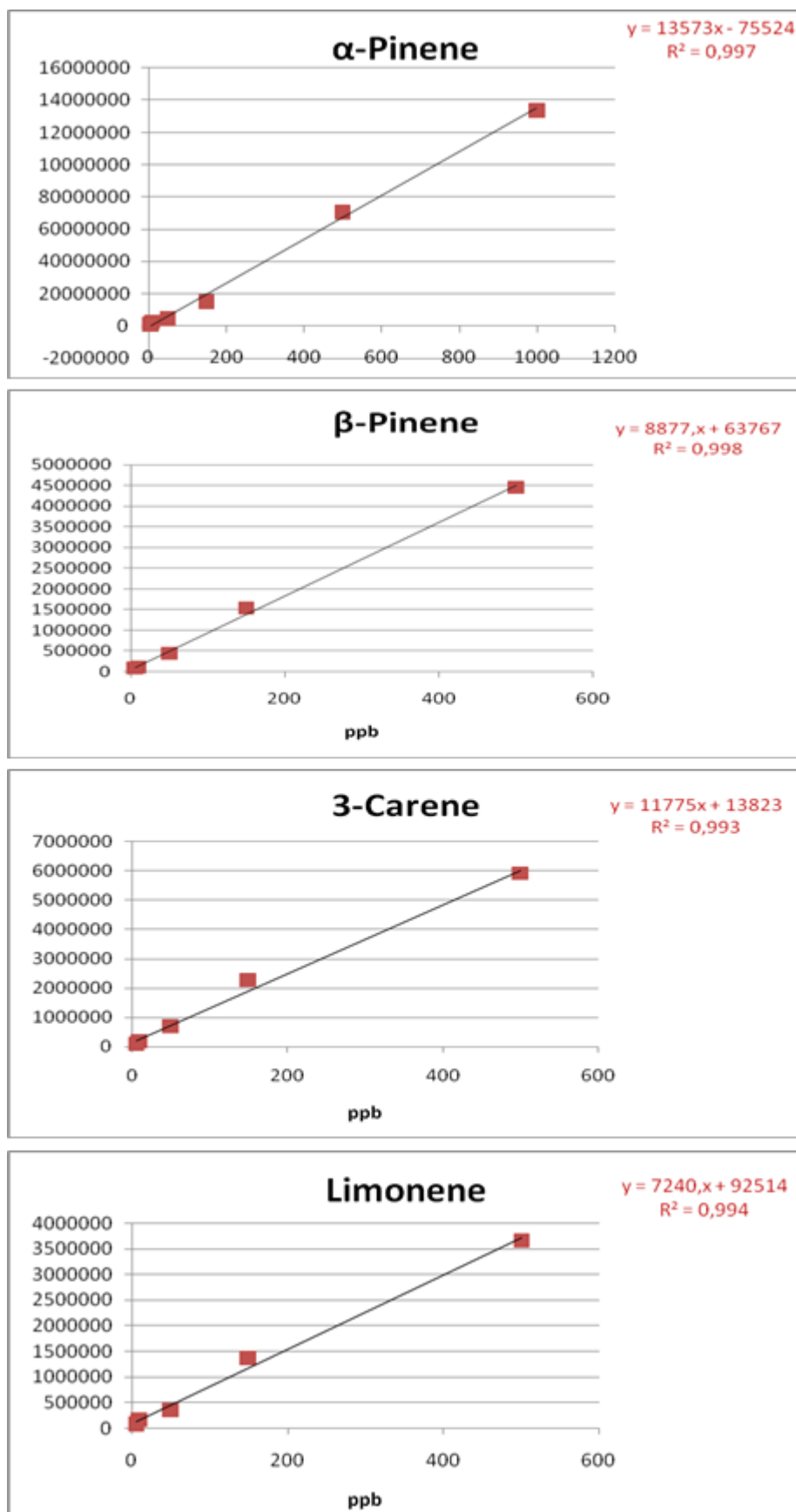


Figura 24. Curve di taratura α -pinene (1), β -pinene (2), Δ 3-carene (3), D limonene (4)

Le curve mostrano una buona linearità nell'intervallo di concentrazione considerato e buoni valori di R^2 .

Sono stati inoltre calcolati sperimentalmente i relativi valori dei Limiti di Quantificazione (LOQ) e dei Limiti di Determinazione (LOD) e dei quattro monoterpeni, analizzati usando la metodica GC/FID, come mostrato in tabella VIII

Composti	LOQ ppb	LOD ppb
α -pinene	5	3
β -pinene	5	2
3-carene	5	2
Limonene	3	1

Tabella VIII. Valori di LOQ e LOD

Gli effluenti campionati corrispondono a diverse fasi del processo di lavorazione degli agrumi e, in particolare, i monoterpeni in esame sono stati ricercati e quantificati nelle acque di lavaggio A, B, e C.

I campioni dei reflui industriali analizzati sono stati raccolti in due aziende di trasformazione degli agrumi site a Palermo e provincia, produttrici di oli essenziali e succhi di limone, arancia, arancia rossa e mandarino. Le due aziende verranno indicate come Azienda 1 ed 2.

Il monitoraggio è stato condotto in periodi dell'anno differenti, corrispondenti a diverso carico di lavoro industriale e alla trasformazione di agrumi diversi, al fine di ottenere una più ampia conoscenza della tipologia e della concentrazione dei terpeni presenti nei reflui

Azienda 1.

Il campionamento delle acque reflue è stato eseguito nei periodi di settembre/ 2006, luglio/2008, maggio/2009 e gennaio/2010.(Tab. IX)

Azienda 1	Tipo di acque	Mese	Carico di lavoro	Agrumi lavorati
1°campionamento	A, B, C	Luglio 2008	Medio/Basso	Nessuna indicazione
2°campionamento	B, C	Maggio 2009	Medio/Alto	Nessuna indicazione
3°campionamento	A, B, C	Gennaio 2010	Alto	Limoni, Arance

Tabella IX. Periodi di campionamenti

Le tipologie di campioni A, B, C, sono state prelevate in triplo per garantire la ripetibilità delle analisi.

Nella tabella X, viene riportata la media dei valori delle concentrazioni dei monoterpeni in esame rilevate nei reflui analizzati nel 1° campionamento.

	A-Pinene	β -Pinene	Δ^3 -Carene	D Limonene
A	58,12	144,21	4,02	11,09
B	85	525	103	181
C	3	3	1	16

Tabella X. Campionamento Azienda 1 2008 (ppb)

Nelle acque derivanti dal depuratore è stata individuata solo la presenza di limonene che rispetto al campione in entrata (acque di raccolta) diminuisce di circa il 90 %, mentre risultano del tutto assenti gli altri tre monoterpeni. Confrontando i cromatogrammi ottenuti dall'analisi GC/FID del campione B e del campione C dal depuratore, riportati in figura 25 e in figura

26, si può osservare una notevole riduzione dell'intensità dei picchi dei quattro analiti nel campione sottoposto al processo di depurazione a fanghi attivi, in cui si evidenzia solo la presenza del picco relativo al limonene, con un tempo di ritenzione intorno a 5,90 minuti e comunque sempre di lieve intensità.

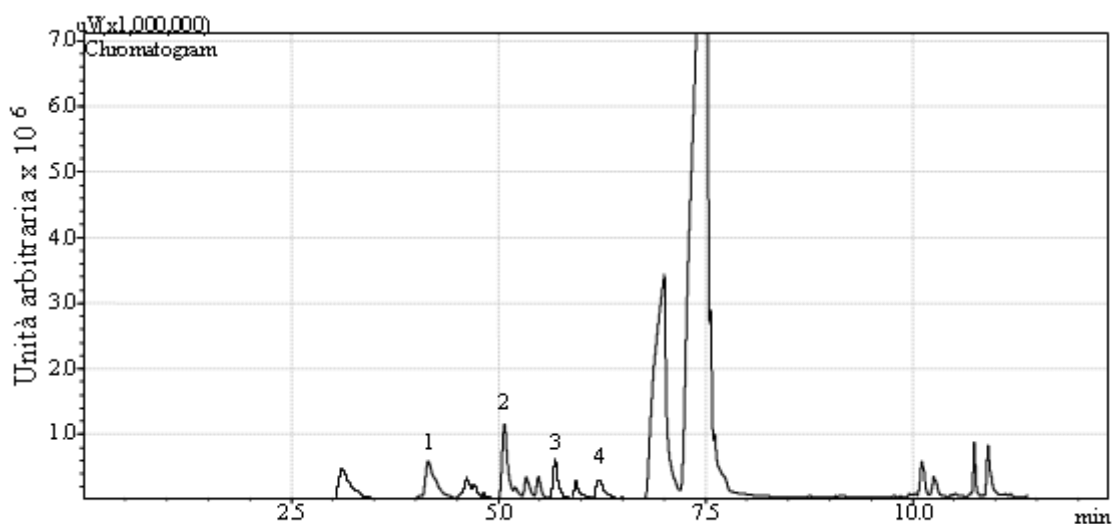


Figura 25. Cromatogramma di un campione di acque di raccolta dell'azienda 1, prelevato nel 2008. Picchi: α -pinene (1); β -pinene (2); Δ 3-carene (3); D limonene (4)

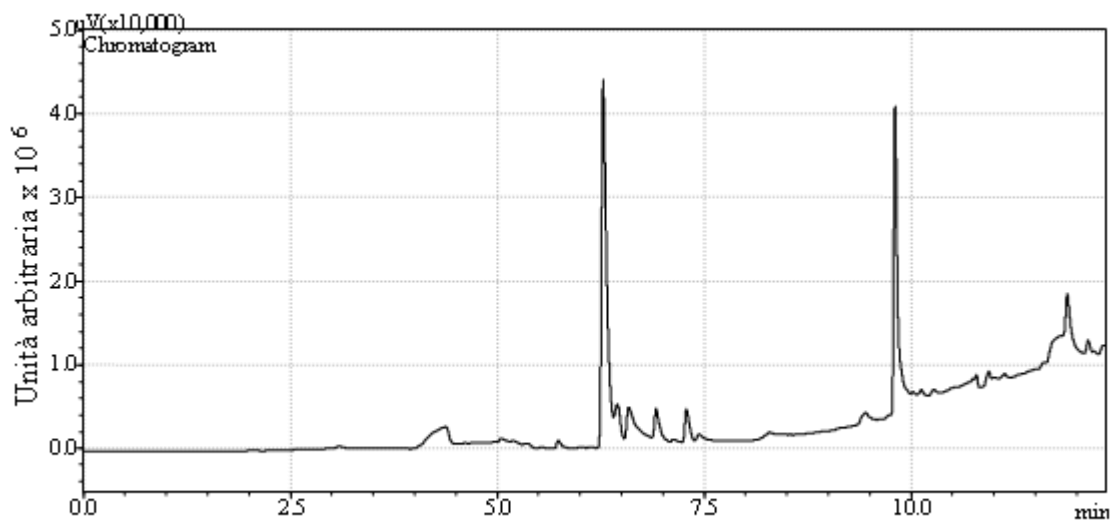


Figura 26. Cromatogramma di un campione delle acque di scarico dell'azienda 1, prelevato nel 2008.

Inoltre è possibile notare che il D-limonene è nelle acque di raccolta quasi tre volte meno abbondante del β -pinene che di fatti non è presente neppure in traccia nelle acque in uscita facendo ipotizzare una cinetica e un percorso di degradazione differente tra i terpeni. Il processo di depurazione è risultato efficace nell'abbattimento dei monoterpeni presi in esame e indubbiamente, riferendosi al D.Lgs. 152/2006 che prevede un valore di concentrazione degli idrocarburi totali per lo scarico in rete fognaria ≤ 10 mg/L, il valore riscontrato nei campioni, facendo riferimento solo ai quattro terpeni presi in esame, è ben al di sotto dei limiti previsti.

Nella campagna di campionamento del 2009, i campioni sono stati raccolti a maggio. Sono stati individuati due punti di campionamento: il primo ha riguardato le acque di lavaggio degli agrumi; il secondo punto di prelievo è stato eseguito sulle acque già sottoposte al processo di depurazione. Le acque di raccolta non sono state campionate a causa dell'impossibilità pratica di raggiungere il condotto delle acque.

Come per le analisi dei campioni del 2008, anche per quelle del 2009 è stato necessario costruire le nuove curve di calibrazione per ciascuno degli analiti presi in esame.

Rifacendoci sempre alla metodica HS-SPME-GC/FID acquisita l'anno precedente, tutte le analisi sono state condotte in triplo sia per gli standard che per i campioni. Mediante analisi GC/FID dei campioni, sono stati ottenuti i seguenti valori mediati di concentrazione, riportati in tabella XI.

	α -Pinene	β -Pinene	Δ^3 -Carene	D-Limonene
A	271	1357	289	28
C	2,98	1,24	0,59	3,79

Tabella XI. Campionamento Azienda I 2009 (ppb).

Anche per le analisi dei campioni del 2009 la somma delle concentrazioni dei quattro monoterpeni è risultata inferiore ai limiti prescritti dalla legge.

Mentre le acque di “entrata” del 2008 corrispondevano alla raccolta ed erano da attribuire ad un ciclo produttivo medio/basso, le acque di lavaggio prelevate nel 2009 provenivano da un intenso ciclo produttivo, infatti le concentrazioni dei monoterpeni considerati erano ben più alte nel 2009 rispetto al 2008, fatta eccezione per il D-limonene. Nei campioni delle acque di lavaggio, sia del 2008 che del 2009, il β -pinene è risultato il composto più abbondante tra i monoterpeni considerati, giungendo ad una concentrazione pari a 1357 ppb nel 2009 (ciclo produttivo intenso).

Nelle acque di lavaggio il D-limonene è meno abbondante degli altri tre terpeni e questo dato risulta coerente con quanto indicato in letteratura, secondo cui questo monoterpene è più abbondante nei prodotti di lavorazione degli agrumi. (Bylaite et al., 2006) e quindi è presente in alte concentrazioni all'interno del frutto. Le acque di lavaggio lasciano intatto il frutto e il D-limonene non viene rilasciato in soluzione.

Nelle acque reflue in uscita, dopo il processo di depurazione a fanghi attivi, si riscontra sempre una concentrazione maggiore di D-limonene rispetto agli altri monoterpeni. Infatti le analisi hanno evidenziato che nel 2008 era stata registrata solo la presenza del D-limonene, mentre nel 2009 oltre alla presenza di tutti e quattro i monoterpeni il D-limonene era il composto più abbondante. Questo potrebbe indicare che il trattamento di depurazione è più efficace per l'abbattimento di α -, β -pinene e Δ^3 -carene rispetto al D-limonene. Per l' α -pinene, β -pinene e Δ^3 -carene l'abbattimento è maggiore del 99%, mentre per il D-limonene risulta dell' 87%; le concentrazioni residue sono infatti nell'ordine di pochi ppb.

I cromatogrammi di un campione di acque di lavaggio degli agrumi e di

un campione di acque di scarico, ottenuti dall'analisi GC/FID, sono mostrati nelle figure 27e 28.

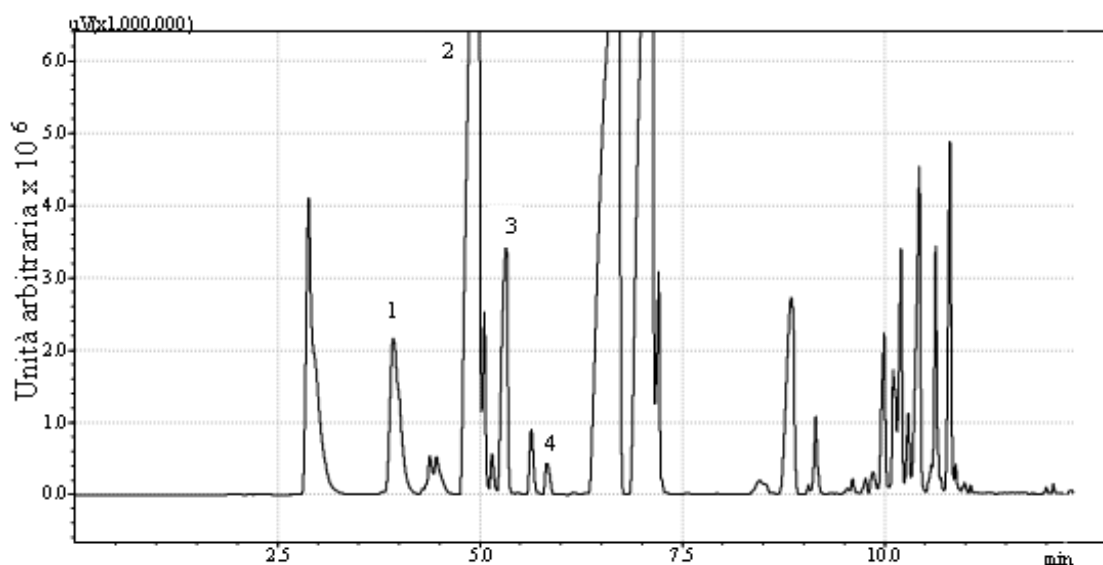


Figura 27. Cromatogramma di un campione di acque di lavaggio dell'azienda A1, prelevato nel 2009.

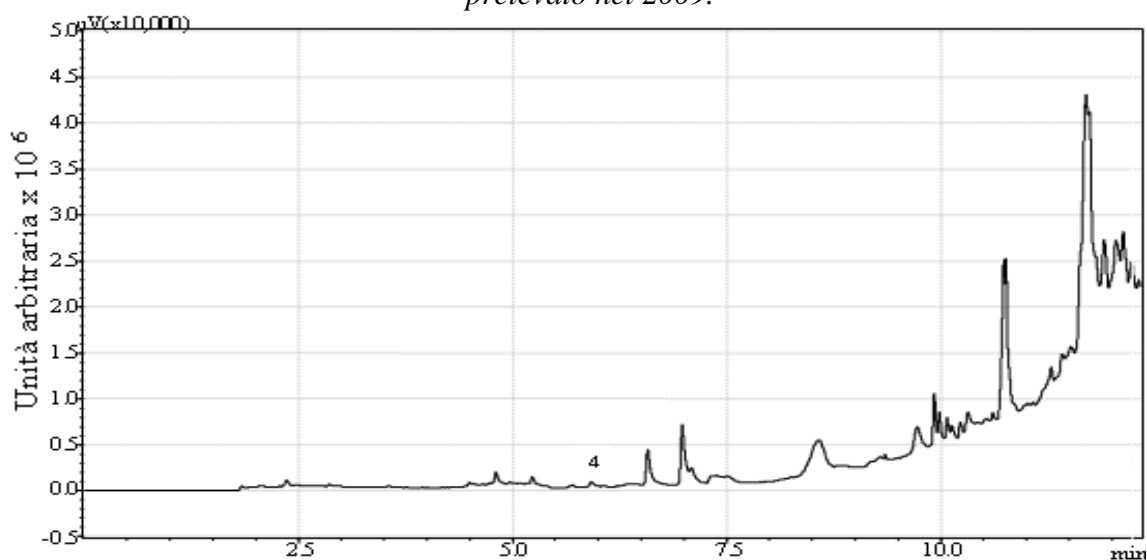


Figura 28. Cromatogramma di un campione di acque di scarico dell' Azienda 1, prelevato nel 2009.

Il campionamento del 2010, vede sempre la standardizzazione degli strumenti e l'analisi in triplo delle acque.

La media dei valori dopo analisi GC/FID sono riportati nella seguente tabella XII:

	α -Pinene	B-Pinene	Δ 3-Carene	DLimonene
A	9,94	24,74	1,77	16,9
B	96,68	87,68	16,12	14,66
C	14,66	8,37	1,6	14,66

Tabella XII. Campionamento Azienda 1 (ppb). 2010

I quattro terpeni sono presenti nelle acque in uscita. Il D-limonene, α -Pinene e il β -Pinene sono confrontabili tra loro, il Δ 3-carene è da 8 a 12 volte meno abbondante degli altri tre. Inoltre, confrontando queste analisi a quelle delle acque in uscita del 2008 e del 2009, non c'è lo stesso rapporto di abbattimento rispetto alle acque di raccolta degli anni precedenti. Le acque C del 2010 presentano il 10% dei terpeni presenti nelle acque di raccolta, contro lo 0,5-1% del 2009 e quasi 0% del 2008. La spiegazione potrebbe essere una saturazione dei fanghi attivi col passare del tempo e dell'attività lavorativa, o la bassa attività dei batteri dei fanghi attivi legata ad una temperatura ambientale meno propizia per la crescita e sviluppo durante il periodo invernale.

Azienda 2.

Il campionamento dei reflui è stato eseguito nel maggio/2009 e nel gennaio/2010 (Tab. XIII).

Azienda 2	Tipo di acque	Mese	Carico di lavoro	Agrumi lavorati
1° campionamento	Lavaggio,Raccolta, Scarico	Maggio 2009	Medio	Limoni
2° campionamento	Lavaggio,Raccolta, Scarico	Gennaio 2010	Alto	Limoni

Tabella XIII. Periodi di campionamenti Azienda 2.

L'azienda non è stata monitorata nel 2008 in quanto la disponibilità alle analisi è stata successiva all'inizio dello studio.

I campioni sono stati prelevati nel 2009 e comprendevano tre tipologie di effluenti: acque di lavaggio degli agrumi, acque di raccolta e acque di scarico. La media delle concentrazioni dei quattro monoterpeni, calcolate mediante analisi HS-SPME-GC/FID dei campioni è riportata in tabella XIV

	α -Pinene	β -Pinene	Δ^3 -Carene	D-Limonene
A	64	204	6	9
B	128	648	178	124
C	232	1029	10	62

Tabella XIV. Campionamento Azienda 2 2009 (ppb).

Sia nelle acque di lavaggio degli agrumi che in quelle di raccolta si nota sempre la maggiore concentrazione del β -pinene rispetto agli altri tre terpeni.

Nelle acque in uscita dal depuratore le concentrazioni del Δ^3 -carene e D-limonene risultavano inferiori a quelle delle acque di raccolta. Stupiscono invece le concentrazioni dell' α -pinene e soprattutto del β -pinene, il cui livello nelle acque in uscita è risultato spiccatamente superiore rispetto a quello delle acque di raccolta. Questo potrebbe fare pensare ad un scarso abbattimento di questi composti.

Nonostante i risultati ottenuti, la somma delle concentrazioni dei singoli terpeni (1,333 mg/L) risultava sempre inferiore ai limiti prescritti per legge (≤ 10 mg/L).

I cromatogrammi di un campione di acque di lavaggio, di un campione di acque di raccolta e di un campione di acque di scarico sono mostrati nelle figura 29.

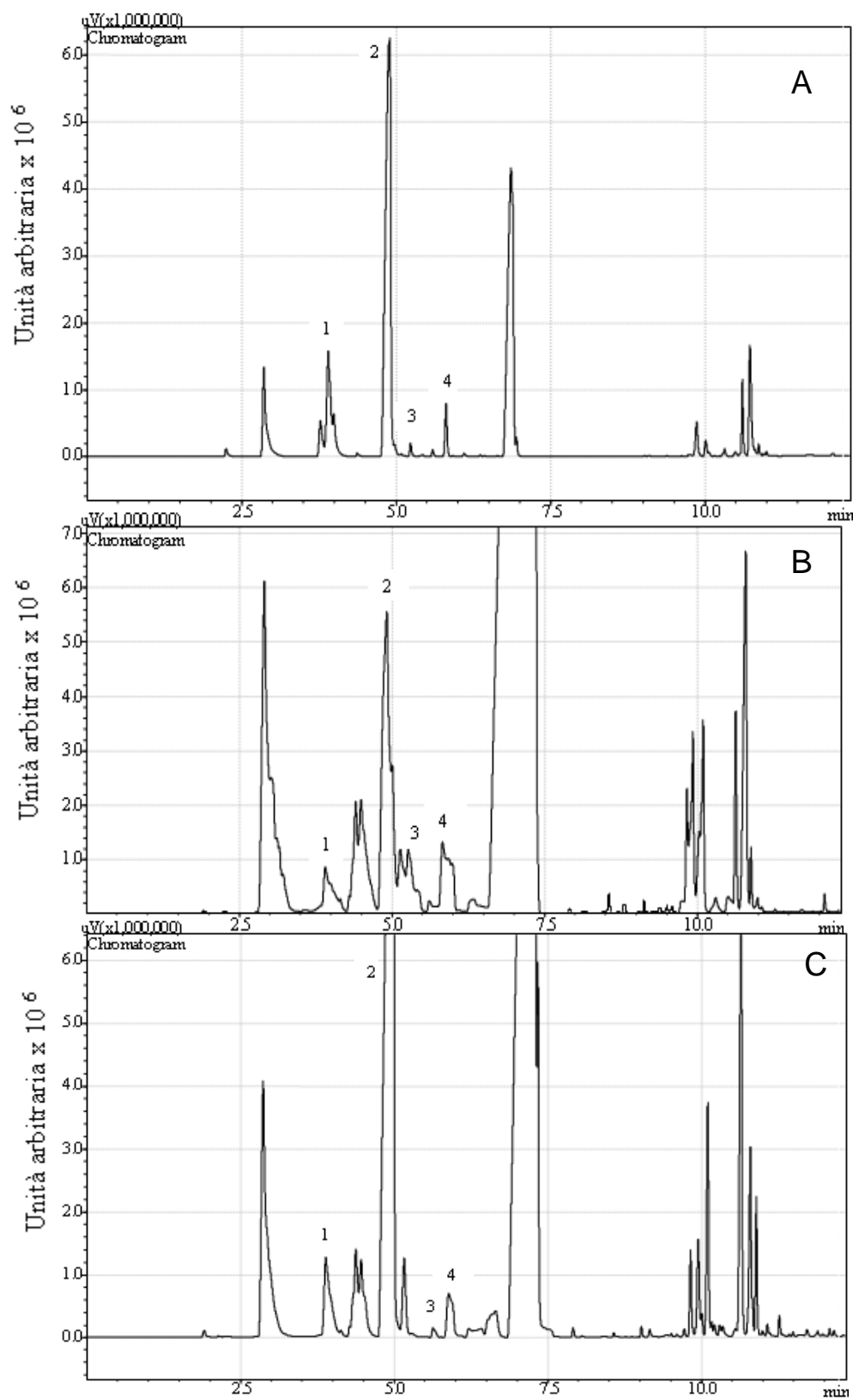


Figura 29. Cromatogramma di un campione di acque di A, B, C dell'Azienda 2.

Le analisi condotte nel 2010 sulle tre tipologie di acque reflui sono state condotte in triplo sia per gli standard che per i campioni. Mediante analisi GC/FID dei campioni, sono stati ottenuti i seguenti valori mediati di concentrazione, riportati in tabella XV.

	α -Pinene	β -Pinene	3-Carene	D-Limonene
A	16,54	55,00	1,57	16,28
B	76,01	96,08	15,1	145,15
C	13,34	12,03	4,73	23,34

Tabella XV. Campionamento Azienda 2 2010 (ppb)

Anche questi dati fanno pensare ad un scarso abbattimento di questi composti nell'Azienda 2.

In conclusione, se si confrontano i valori dei quattro terpeni delle acque dell'Azienda 1 a quelle dell'Azienda 2 dello stesso periodo di campionamento, si può affermare che l'Azienda 1 ha un sistema di depurazione delle acque più efficiente dell'azienda 2.

Infatti, in riferimento al 2009 (Tab. XI – Tab. XIV), nonostante nel primo caso manchino i dati riferibili alle acque di raccolta, si può notare come già le acque di lavaggio vedono nell'Azienda 1 una maggiore concentrazione di terpeni contro una minore quantità di questi nelle acque in uscita.

Nel 2010 valori dei singoli terpeni (Tab. XII - Tab. XV), a conferma dei dati dell'anno precedenti, indicano una minore efficienza del sistema di depurazione rispetto al sistema di depurazione dell'Azienda 1.

Il processo di depurazione con fanghi attivi risulta necessario ed efficiente, permettendo di abbattere quasi completamente le sostanze presenti negli effluenti di lavorazione prima dell'immissione in rete fognaria.

L'abbattimento di sostanze bioresistenti dipende dal carico lavorativo e dal sistema di depurazione, la cui qualità ed efficacia cambia da azienda a azienda.

Nonostante sia stato evidenziato che in alcuni casi permangono delle tracce dei terpeni presi in esame, questi risultano sempre al di sotto dei limiti prescritti dalla legge.

Valutazione della capacità mutagena dei terpeni e dei reflui in *Salmonella typhimurium*

Il test di Ames, è stato impiegato allo scopo di valutare la capacità dell' α -pinene, dell' β -pinene, del D-limonene e del Δ^3 -carene di interagire con la molecola del DNA. A tale scopo 10^8 cellule di *Salmonella typhimurium* TA100, che presenta la mutazione nel gene HisG che codifica per il primo enzima della biosintesi dell'istidina, sono state inglobate in agar ed esposte ai singoli monoterpeni o alla miscela dei quattro, in presenza o meno di S9 mix.

Sono state utilizzate soluzioni sintetiche dei quattro terpeni equimolecolari corrispondenti a quelle rilevate nelle acque del primo campionamento eseguito nelle aziende di trasformazione degli agrumi. In particolare sono state prese in considerazione le acque di lavaggio (A) prima del trattamento di depurazione (B) e dopo (C) (Tab. XVI).

	α -Pinene	β -Pinene	Δ^3 -Carene	D-Limonene
A	58,12	144,21	4,02	11,09
B	85	525	103	181
C	3	3	1	16

Tabella XVI. Concentrazioni in ppm dei terpeni nelle acque campionate nel 2008

Come si può evincere dalle figure 30 e 31, il test di reversione genica ha rivelato che non vi è aumento del numero dei revertenti rispetto al non trattato dopo trattamento con i singoli terpeni alle concentrazioni a B e C. La corretta esecuzione del test e quindi l'attendibilità dei risultati ottenuti sono confermate dal controllo positivo. Infatti, il Metilmetansulfonato, noto mutageno, come atteso, induce un significativo aumento dei reverenti (Fig.30). (Tale dato, che si è ripetuto in tutti i test di Ames eseguiti, è stato

omesso, per praticità dalle successive rappresentazioni grafiche).

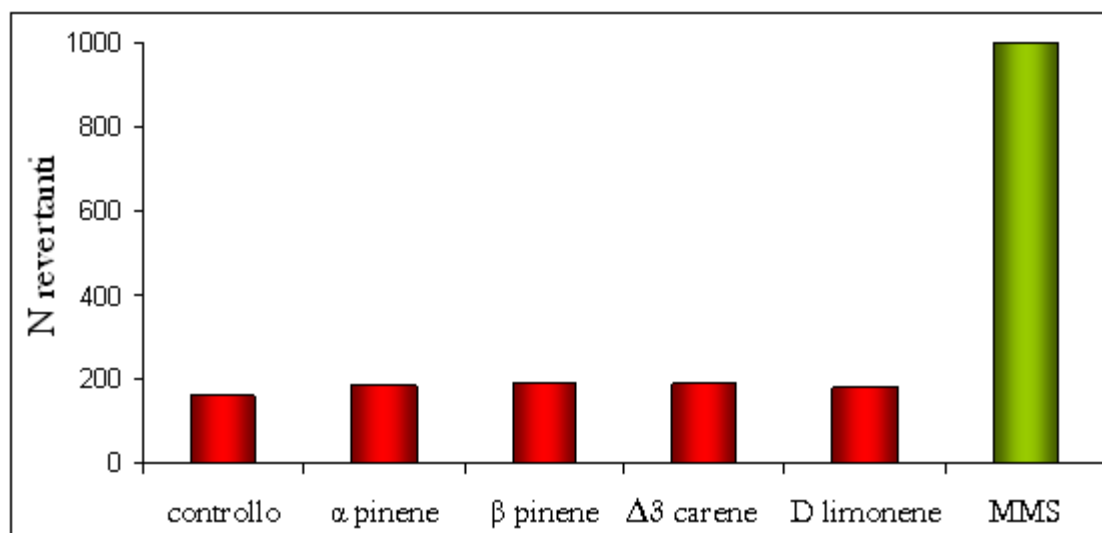


Figura 30. Test di Ames con singoli terpeni a concentrazione equimolare alle acque B.

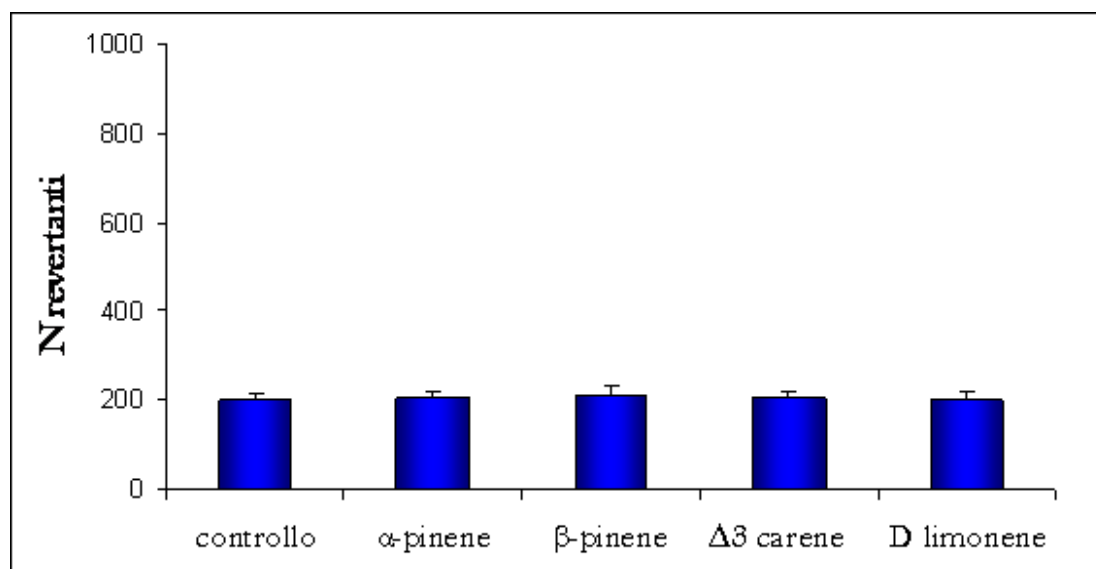


Figura 31. Test di Ames dei singoli terpeni a concentrazione equimolare alle acque C.

Un sistema di attivazione metabolica (S9 mix 10%) è stato utilizzato al fine di valutare l'eventualità che i terpeni siano dei promutageni, cioè sostanze che non sono di per se mutagene ma che possono diventarlo in seguito alla trasformazione chimica operata dagli enzimi del metabolismo cellulare, dando origine a molecole in grado di indurre mutazioni geniche. I

dati hanno indicato (Fig. 32) che i singoli terpeni non hanno capacità di indurre mutazione geniche anche in presenza di attivazione metabolica.

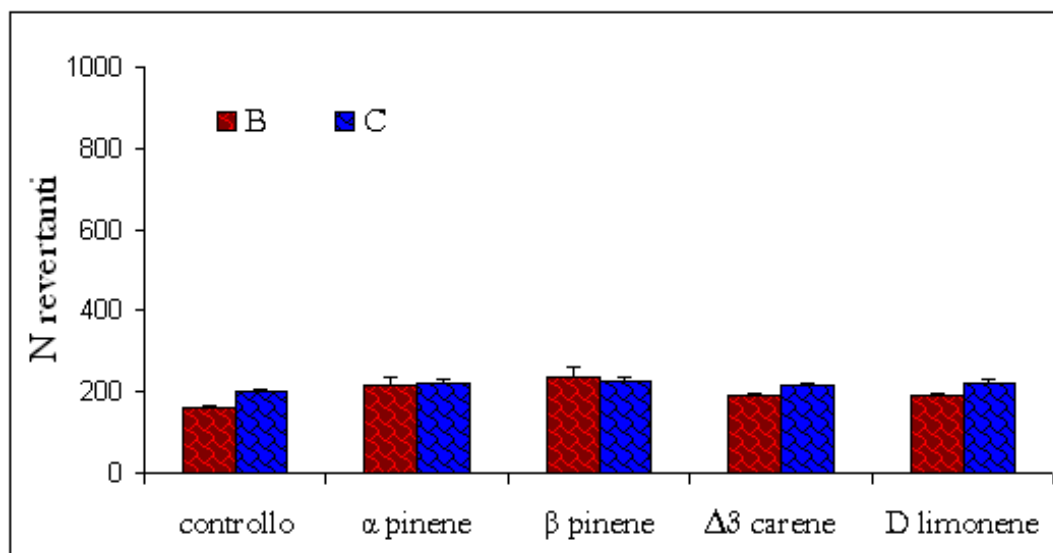


Figura 32. Test di Ames con S9 mix con i singoli terpeni a concentrazione equimolari delle acque B e C.

Pertanto in accordo con altri autori (Gomes-Carniero et al., 2005), possiamo concludere che i terpeni non sono mutagenici in *Salmonella* TA100, sia in presenza che in assenza di attivazione metabolica. Altri autori hanno recentemente mostrato che i terpeni in esame non risultano genotossici anche in altri ceppi *S. typhimurium* come il ATCC 14028 (Ary G. S. et al., 2010).

Inoltre, poichè i quattro terpeni sono presenti contemporaneamente nella nei campioni di acque reflue analizzate, il test di Ames è stato condotto combinando insieme i quattro composti. Il test è stato eseguito con e senza attivatore metabolico S9 mix. I risultati indicano che in assenza di attivatore metabolico non aumenta il numero di revertenti, mentre in presenza di attivatore metabolico, indipendentemente dalle concentrazioni, la miscela dei quattro terpeni induce sempre un significativo aumento del numero dei revertenti. Tale aumento è altamente significativo alla concentrazione più

alta (B) come risulta evidente dalla figura seguente (Fig. 33).

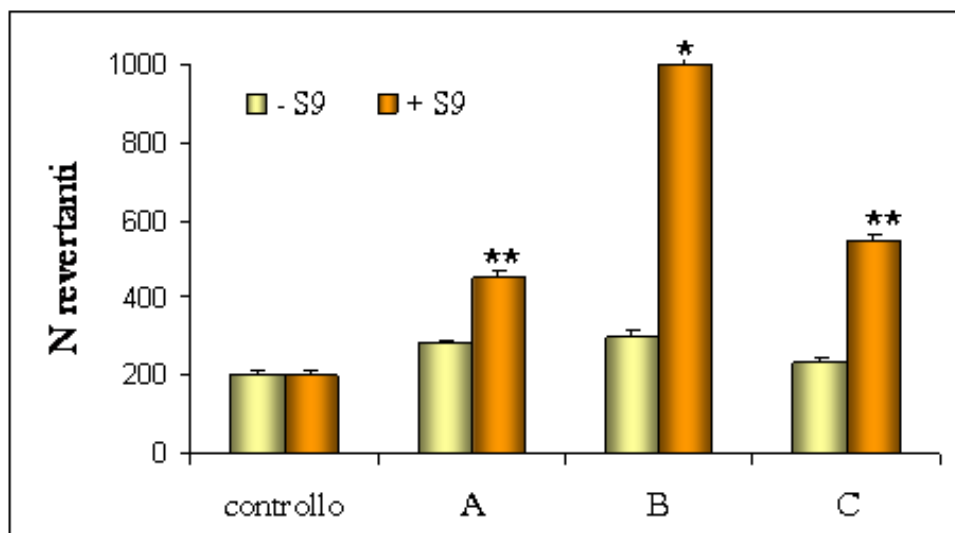


Figura 33. Test di Ames con e senza attivatore metabolico S9 mix , con la somma di tutti e quattro i terpeni alle concentrazioni delle acque A, B e C. * $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$ (secondo t test)

L'assenza di capacità mutagena sia diretta che indiretta dei singoli terpeni è documentata in letteratura; l'interessante novità dei risultati, da me ottenuti, è l'aver messo in luce per la prima volta che la miscela dei quattro terpeni acquista capacità mutagene dopo attivazione metabolica

Valutazione degli effetti tossici e genotossici dei reflui in cellule V79 di Hamster cinese

Gli effetti tossici e genotossici dei terpeni presenti nei reflui sono stati valutati su una linea cellulare di mammifero stabilizzata in vitro, le V79 di Hamster Chineso, mediante il saggio clonogenico, il test di mutazione al locus *hprt* e il comet assay.

Sono state preparate soluzioni dei terpeni sintetici a concentrazioni equimolari a quella dei diversi reflui corrispondenti ai campionamenti effettuati nel 2008 (Tab. XVII).

	α -Pinene	β -Pinene	Δ^3 -Carene	D-Limonene
A	0,4	0,8	0,03	0,08
B	0,6	3,6	0,75	1,36
C	0,02	0,02	0,007	0,12

Tabella XVII. Concentrazioni (μM) dei terpeni nelle acque reflue (campionamento 2008) utilizzate nei test di mutagenesi.

In particolare sono state considerate le quantità dei singoli terpeni corrispondenti alle acque di lavaggio (A), alle acque prima del trattamento di depurazioni (B) e di uscita dal depuratore (C). Inoltre sono stati eseguiti trattamenti con soluzioni contenenti tutti e quattro i terpeni alle concentrazioni corrispondenti alle acque A, B e C rispettivamente.

Saggio clonogenico

Il saggio clonogenico, che valuta la capacità delle cellule di sopravvivere a sostanze xenobiotiche, si basa sul confronto tra il numero delle colonie

ormate dalle cellule trattate con la sostanza in esame e il numero delle colonie formate dalle cellule non trattate.

Per valutare gli effetti tossici, inizialmente le cellule V79 di H.Chinese sono state esposte per 1 h a soluzioni sintetiche dei singoli terpeni (D-limonene, α e β -pinene e Δ 3-carene) equimolari alle concentrazioni riscontrate nelle acque B (di raccolta), dove i terpeni sono presenti a concentrazioni più elevate che nelle acque A e C (Tab. XVII).

I risultati del test, riportati in tabella XVIII indicano che alla concentrazione testata di ciascun terpene, la sopravvivenza cellulare diminuisce di circa il 50%.

	Sopravvivenza cellulare (%)
Controllo	100
α -Pinene	54,53 \pm 3,7
β -Pinene	58,8 \pm 6,2
D-limonene	51,53 \pm 8,9
Δ 3-carene	54,75 \pm 8,8

Tabella. XVIII. Sopravvivenza delle cellule esposte per 1h ai singoli terpeni alle concentrazioni corrispondenti alle acque B

Successivamente, le cellule sono state esposte ai quattro terpeni, alle concentrazioni corrispondenti alle acque di lavaggio (A), alle acque prima della depurazione (B) e dopo depurazione (C) per tempi più lunghi (fino alle 36 ore). I risultati mostrati in figura 34, indicano che non c'è differenza tra la tossicità dei quattro terpeni, infatti l'andamento delle curve è molto simile tra loro indipendentemente dalle concentrazioni che possono variare anche di tre ordini di grandezza.

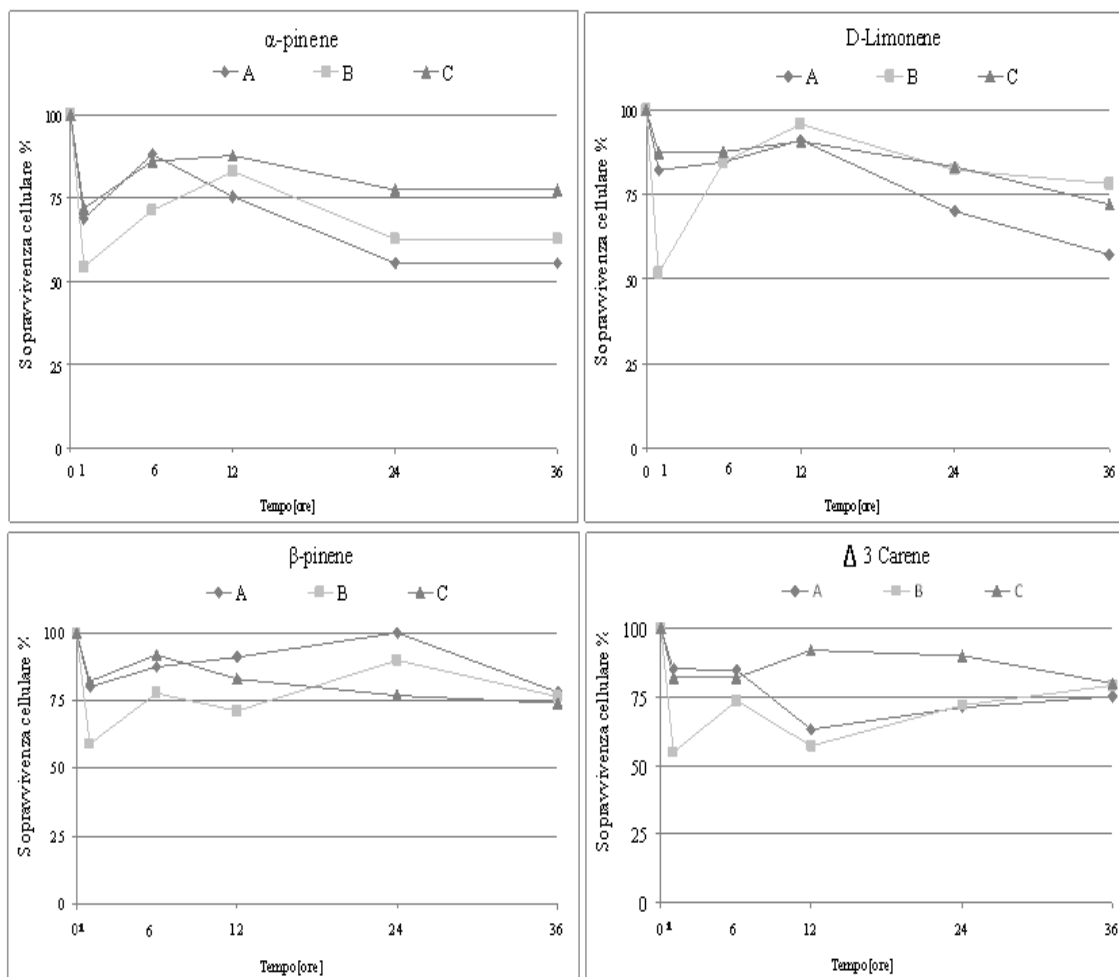


Figura 34. Sopravvivenza dopo trattamento per tempi diversi con i singoli terpeni alle concentrazioni equimolari a quelle delle acque A, B e C

Inoltre, l'effetto tossico indotto da ciascun terpene dopo 1 h di trattamento non aumenta con l'aumentare del tempo di trattamento.

Risultati analoghi sono stati ottenuti quando le cellule sono state trattate contemporaneamente con i quattro terpeni alle concentrazioni delle acque A, B e C: le curve di sopravvivenza seguono lo stesso andamento della sopravvivenza dei singoli terpeni (Fig. 35): tutte e tre le miscele inducono una diminuzione della sopravvivenza di circa il 50% dopo 1 ora di esposizione e un aumento della sopravvivenza con l'aumentare del tempo di esposizione sino ad arrivare ad un platou a 24 h.

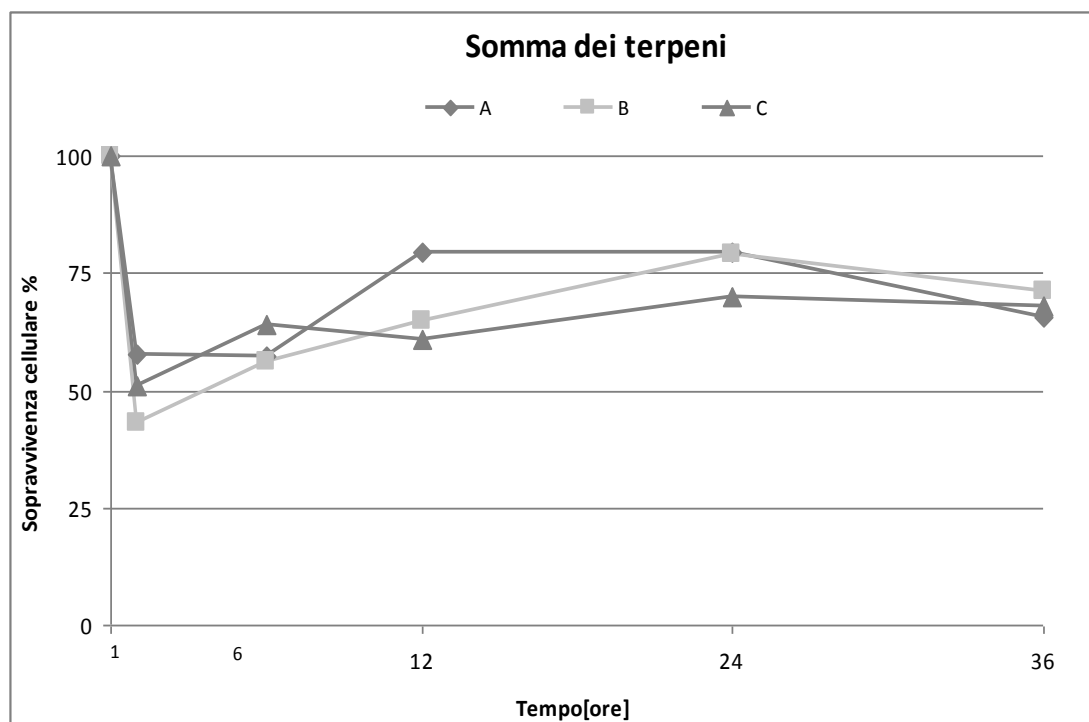


Figura 35. Sopravvivenza dopo trattamento per tempi diversi con i quattro terpeni alle concentrazioni equimolari a quelle delle acque A, B e C.

La progressiva diminuzione degli effetti tossici con l'aumentare del tempo potrebbe essere dovuta alla elevata volatilità dei terpeni che comporta una diminuzione della loro concentrazione nella soluzione acquosa. Dati questi risultati, per l'esecuzione del test di mutazione genica è stato scelto il tempo di 1 ora di esposizione. Da questi risultati si ricava che, in confronto ai risultati ottenuti dal trattamento con i singoli terpeni, la miscela di essi non ha alcun effetto additivo o sinergistico sulla sopravvivenza delle cellule. Piuttosto, considerato che la tossicità della miscela è inferiore alla somma dei componenti, è possibile che tra i terpeni si verifichi antagonismo, che potrebbe essere antagonismo chimico se i terpeni all'interno della cellula reagiscono tra loro a formare un composto meno tossico o antagonismo di competizione se hanno un bersaglio comune (EPA: Environmental Protection Agency, 2000).

Test di mutazioni al locus *hgprt*

Per valutare la capacità di indurre mutazione genica, è stato utilizzato il test HGPRT. Il gene *hgprt* è localizzato sul cromosoma X e codifica per l'enzima ipoxantinafosforibosil trasferasi (HGPRT). Questo enzima catalizza la conversione della guanina e ipoxantina, ma anche della 6-tioguanina (TG), analogo tossico della guanina, ai corrispondenti nucleosidi-5' monofosfati. Le cellule, che in seguito a un evento di mutazione al locus *hgprt* hanno perso la funzionalità dell'enzima HGPRT, non incorporano nel DNA TG e pertanto sono in grado di crescere in un mezzo selettivo contenente questo analogo tossico.

Cellule V79 sono state sottoposte a trattamenti con i singoli terpeni, α -pinene, β -pinene, *D*-limonene e Δ^3 -carene per selezionare mutanti 6-tioguanina resistenti. Le cellule trattate per 1h sono state seminate, in un terreno completo contenente 6-tioguanina, subito dopo il trattamento (T_0), dopo tre (T_{72}) e sei giorni (T_{144}).

I risultati di tre trattamenti indipendenti con i singoli terpeni a concentrazioni corrispondenti alle acque B, indicano che a T_0 e a T_{72} nessuno dei terpeni è in grado di indurre mutazione genica. Infatti non vi è aumento della frequenza di mutanti indotti rispetto a quella spontanea né subito dopo il trattamento né dopo 72 h di crescita in terreno senza 6-tioguanina (Tab. XIX).

Un risultato diverso, ma di difficile interpretazione, è stato ottenuto quando le cellule sono state seminate in mezzo selettivo dopo sei giorni dal trattamento (T_{144}). In queste condizioni si osserva un incremento della frequenza dei mutanti che diventa 4,4 volte la frequenza dei mutanti spontanei nelle cellule trattate con *D*-limonene.

	Mutanti 6TG.res/10 ⁶ cell.vit. T ₀	Mutanti 6TG.res/10 ⁶ cell.vit. T ₇₂	Mutanti 6TG.res/10 ⁶ cell.vit. T ₁₄₄
Controllo	1,4±0,2	1,4±0,2	1,4±0,2
A-Pinene	0,4±0,3	0,8±0,1	2,4±0,8
B-Pinene	0,8±0,6	0,2±0,01	2±0,7
limonene	1,9±1,3	1,1±0,2	6,2±0,2
Carene	0,8±0,5	0,2±0,03	2±0,9

Tabella. XIX. Frequenza dei mutanti indotti dal trattamento di 1h con i singoli terpeni presenti nelle acque di raccolta B). I valori riportati sono ottenuti dalla misurazione di tre esperimenti indipendenti (medie ± SD)

Questo dato potrebbe trovare una giustificazione nella già nota capacità del limonene di generare molecole tossiche nell'interazione con altre sostanze per attività dei doppi legami (Wolkoff P. et al., 2000) con possibile sbilanciamento cellulare tra la produzione e l'inattivazione dei radicali portando a stress ossidativo. Gli effetti biologici dell' α -pinene (Barbata et al., inviato a Toxicology in Vitro) e del D-limonene (manoscritto in preparazione) in cellule di mammifero in coltura sono stati argomento di una approfondita indagine nel laboratorio di Mutagenesi dove ho svolto la mia tesi di dottorato. I risultati ottenuti hanno evidenziato che entrambi i terpeni, che non rispondono al modello di azione (MOA) del genotossico diretto, inducono instabilità genomica interferendo con l'apparato mitotico. Pertanto, l'instabilità genomica potrebbe essere la causa dell'aumentata frequenza dei mutanti spontanei a tempi lontani dal trattamento in modo analogo a quanto si verifica in seguito al trattamento con radiazioni ionizzanti (Little J.B. et al. 1990). Quando le cellule sono esposte contemporaneamente ai quattro terpeni, si osserva un significativo ($p < 0.01$) incremento della frequenza dei cloni 6-TG resistenti al tempo T₇₂ nelle cellule trattate con concentrazioni corrispondenti a quelle determinate nelle acque di lavaggio (A) e nelle acque di raccolta (B), mentre si ha un debole incremento quando le cellule sono

trattate con concentrazioni dei quattro terpeni corrispondenti ai reflui biologicamente trattati (C). Al tempo di espressione T_{144} l'incremento dei mutanti risulta significativo per tutte e tre le miscele impiegate (Tab. XX).

	Mutanti 6TG.res/10 ⁶ cell.vit. T_0	Incremento rispetto. al controllo T_0	Mutanti 6TG.res/10 ⁶ cell.vit. T_{72}	Incremento rispetto al controllo T_{72}	Mutanti 6TG.res/10 ⁶ cell.vit. T_{144}	Incremento rispetto controllo T_{144}
Controllo	1,4±0,2	1	1,4±0,2	1	1,4±0,2	1,00
A	4,14±2,9	2,95	7,78±1,8	5,55*	8±1,5	5,71*
B	3,92±0,5	2,8	8,42±1,5	6,01*	13,6±2,8	9,71*
C	2,1±1,8	1,5	3,9±0,7	2,78	6±1,8	4,29*

Tabella XX. Frequenza dei mutanti indotti dal trattamento di 1h con tutti e quattro i terpeni presenti nelle acque in uscita (A), in quelle di lavaggio (B) e di raccolta (C). I valori riportati sono ottenuti dalla misurazione di tre esperimenti indipendenti (medie ± SD; * $p < 0.025$, secondo il t-test)

Questi risultati, oggetto di una mia recente pubblicazione (Catanzaro I. et al., 2011) complessivamente confermano che la miscela dei quattro terpeni ha capacità mutagene, già messa in evidenza con il test di Ames. Tuttavia, mentre in *Salmonella*, perché si abbia effetto mutageno, la miscela deve essere attivata metabolicamente, nelle cellule di mammifero essa agisce da mutageno diretto. Ciò suggerisce che, all'interno della cellula eucariotica tra i terpeni, grazie al metabolismo cellulare si possano verificare interazioni chimiche e biologiche tali da conferire alla miscela capacità mutagene.

Valutazione della genotossicità dei terpeni mediante il comet assay

Il comet assay permette di visualizzare il danno al DNA indotto su singola cellula, dovuto a rotture a singolo e a doppio filamento nel DNA, presenza di addotti, come i siti alcali labili o le incisioni causate dalle attività di riparazione per escissione dei nucleotidi (Moller P. et al., 2000).

Per l'esecuzione del test, cellule V79 di Hamster cinese sono state esposte ai quattro terpeni o all'insieme di essi alle concentrazioni rilevate nel campionamento del 2008 in due delle tre tipologie di acque monitorate, ovvero le acque con le quantità più alte di terpeni (B) e quelle con le più basse (C). Il trattamento è stato eseguito per tempi diversi di esposizione (1h, 6 h e 24 h) e alla fine del trattamento, prima del processamento delle cellule, è stata valutata la vitalità cellulare con il trypan blu, allo scopo di evitare falsi positivi. I risultati hanno indicato che la vitalità sia nei trattamenti con i singoli terpeni che nei trattamenti con tutti e quattro terpeni presenti contemporaneamente era \geq al 70% del non trattato, rientrando in uno dei parametri richiesti per l'attendibilità dei risultati del comet assay (Tice R.R. et al., 2000). Pertanto le diverse concentrazioni, i tempi e le modalità di trattamento, sopra specificati, sono state impiegati per valutare quante cellule sono state danneggiate e qual'è l'entità del danno indotto.

Infatti, in assenza di danno rimanendo intatta la struttura superavvolta del DNA, il nucleo, visto al microscopio a fluorescenza, risulta compatto e rotondeggiante, mentre, nel caso in cui vi siano rotture nel DNA, i frammenti carichi negativamente a livello dei gruppi fosfato, migreranno verso l'anodo durante la corsa elettroforetica, conferendo al materiale nucleare la morfologia di una cometa (da cui il saggio prende il nome). Pertanto,

basandosi sulla differente morfologia del nucleo viene condotta l'analisi qualitativa: le cellule vengono classificate in nuclei compatti, nuclei con coda e nuclei altamente danneggiati o fantasma (Fig. 33); in particolare i nuclei fantasma, nei quali il DNA della testa è migrato quasi completamente nella coda, sono considerate cellule apoptotiche.

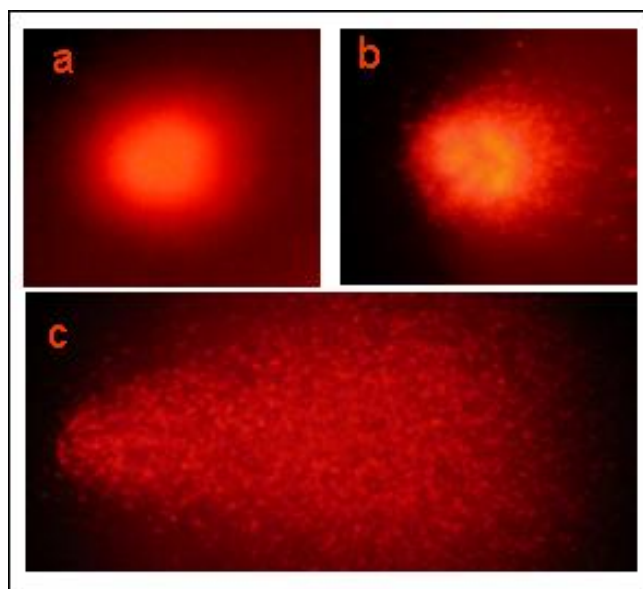


Figura 33. Immagine a microscopio a fluorescenza di nuclei non danneggiati (a); nuclei danneggiati (b); nuclei fantasma (c).

I risultati ottenuti dall'analisi qualitativa condotta sulle cellule trattate con i singoli terpeni alle concentrazioni corrispondenti alle acque B, mostrano che ogni terpene determina la formazione di nuclei con coda e nuclei altamente danneggiati o fantasma (Fig. 34 A-C). In particolare, la percentuale di nuclei danneggiati è sempre maggiore nelle cellule trattate con Δ^3 -carene e D-Limonene. Inoltre, per tutti e quattro i terpeni, la percentuale totale di cellule danneggiate diminuisce con l'aumentare del tempo di esposizione. Tale andamento non si ripete quando i terpeni sono combinati in un'unica soluzione B: la percentuale di cellule danneggiate è del 50% indipendentemente dal tempo di trattamento (Fig. 34 D).

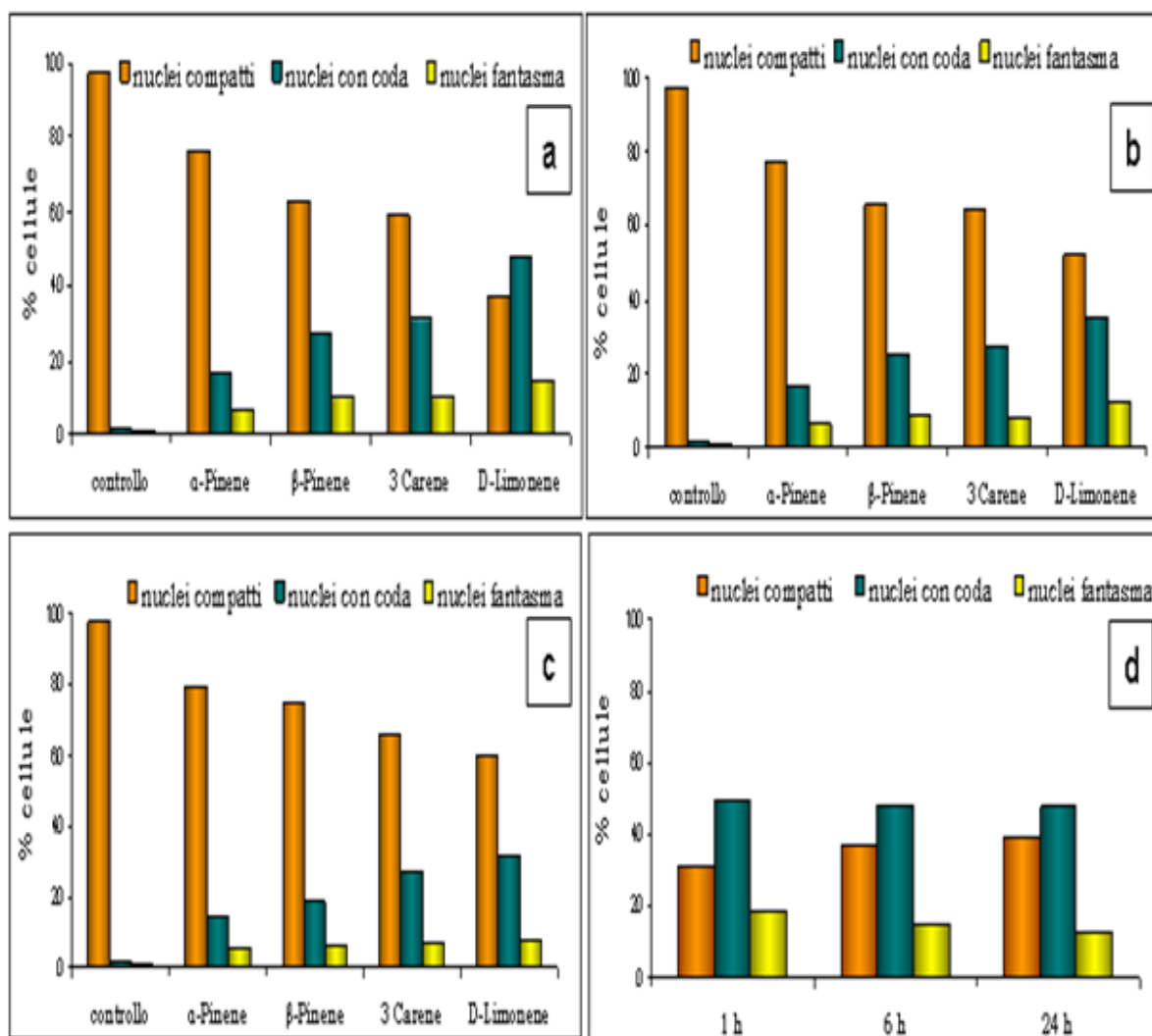
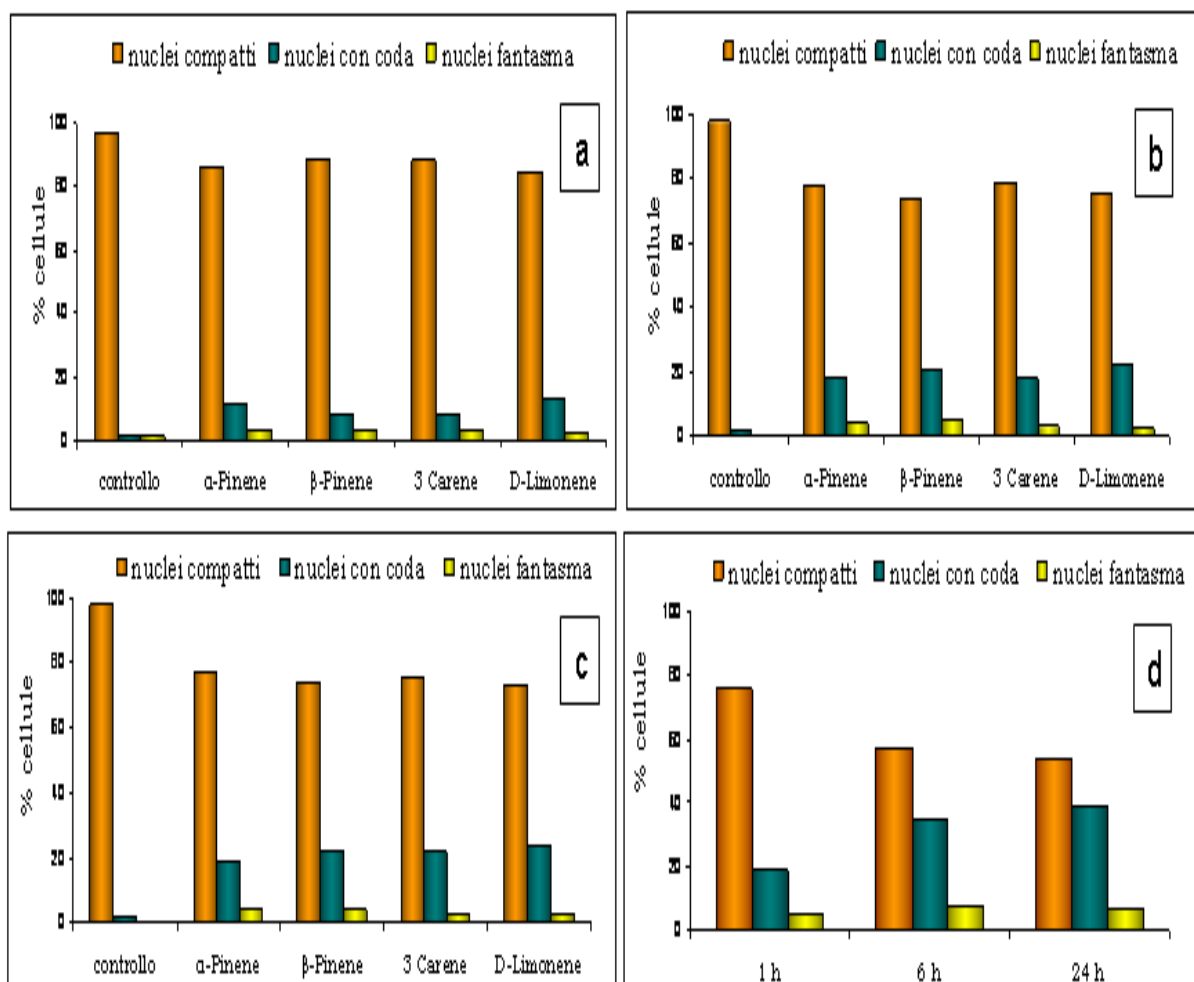


Figura 34. Risultati dell'analisi quantitativa ottenuti dopo trattamenti con terpeni alle concentrazioni corrispondenti alle acque B: **a)** trattamenti con singoli terpeni per 1 h; **b)** trattamenti con singoli terpeni per 6 h; **c)** trattamenti con singoli terpeni per 24 h; **d)** trattamento con i quattro terpeni.

I risultati ottenuti dall'analisi qualitativa dei nuclei dopo trattamenti con i singoli o combinati terpeni alle concentrazioni corrispondenti alle acque C, confermano la sensibilità del comet assay a evidenziare la capacità di tali sostanze di indurre danno al DNA. In ogni trattamento singolo la percentuale di nuclei danneggiati è più bassa rispetto ai precedenti risultati (Fig. 36), ma aumenta con l'aumentare del tempo di esposizione (Fig. 35 a-d). La percentuale di nuclei danneggiati dalla miscela dei terpeni è sempre maggiore dei danni indotti dai singoli ma si mantiene sempre al di sotto della



loro somma (Fig. 35 D).

Figura 35. Risultati dell'analisi quantitativa ottenuti dopo trattamenti con terpeni alle concentrazioni corrispondenti alle acque C: **a)** trattamenti con singoli terpeni per 1 h; **b)** trattamenti con singoli terpeni per 6 h; **c)** trattamenti con singoli terpeni per 24 h; **d)** trattamento con i quattro terpeni.

Le valutazioni quantitative, condotte dopo trattamento di 1h con i singoli terpeni e la loro miscela, alle concentrazioni corrispondenti alle acque B e C, hanno mostrato che i valori di L Tail e TM sono sempre altamente significativi ($p < 0,0001$) (Fig. 36-37-38) rispetto ai valori del non trattato. In particolare, vale la pena sottolineare che entrambi i parametri utilizzati per valutare il danno, nei trattamenti combinati non si discostano dai valori medi dei trattamenti singoli. Ciò potrebbe essere giustificato dalla

possibilità che la miscela induca la formazione di cross-links, che notoriamente impediscono la corsa elettroforetica (Peggy P.L. and Banáth J.P., 2006).

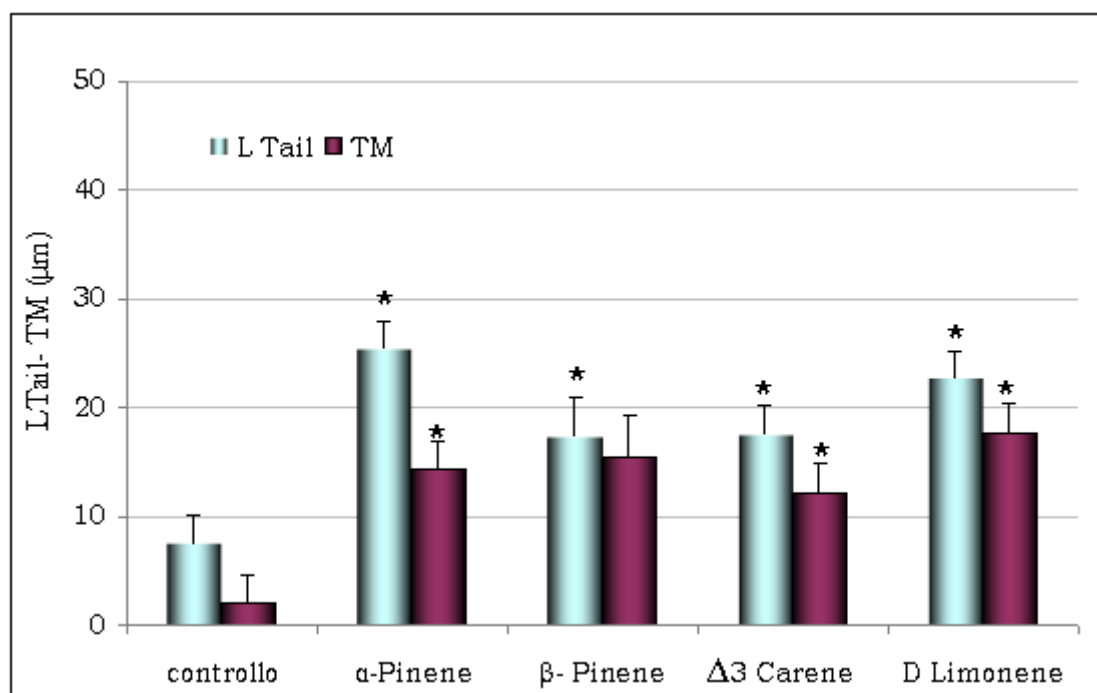


Figura 36. Valori *L Tail* e *TM* dopo trattamento di 1 h con i singoli terpeni alle concentrazioni corrispondenti alle acque B. I valori riportati sono ottenuti dalla misurazione di tre esperimenti (medie \pm SD * $p < 0,0001$ secondo Kruskal Wallis)

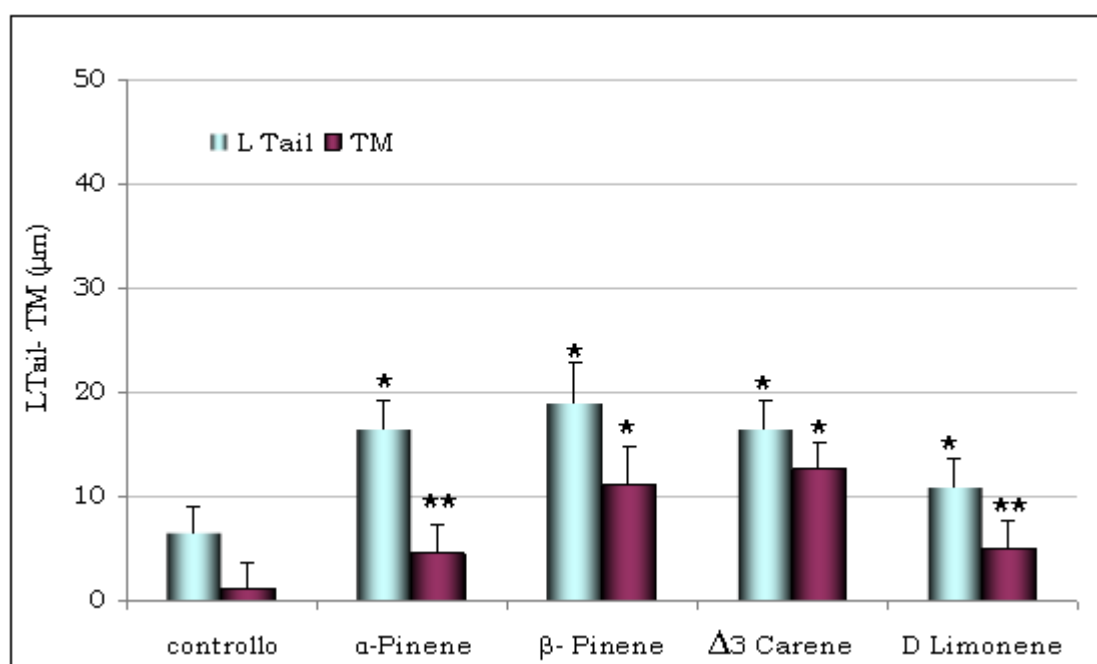


Figura 37. Valori *L Tail* e *TM* dopo trattamento di 1 h con i singoli terpeni alle

concentrazioni alle acque C. I valori riportati sono ottenuti dalla misurazione di tre esperimenti indipendenti (medie \pm SD; * $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$ secondo Kruskal Wallis)

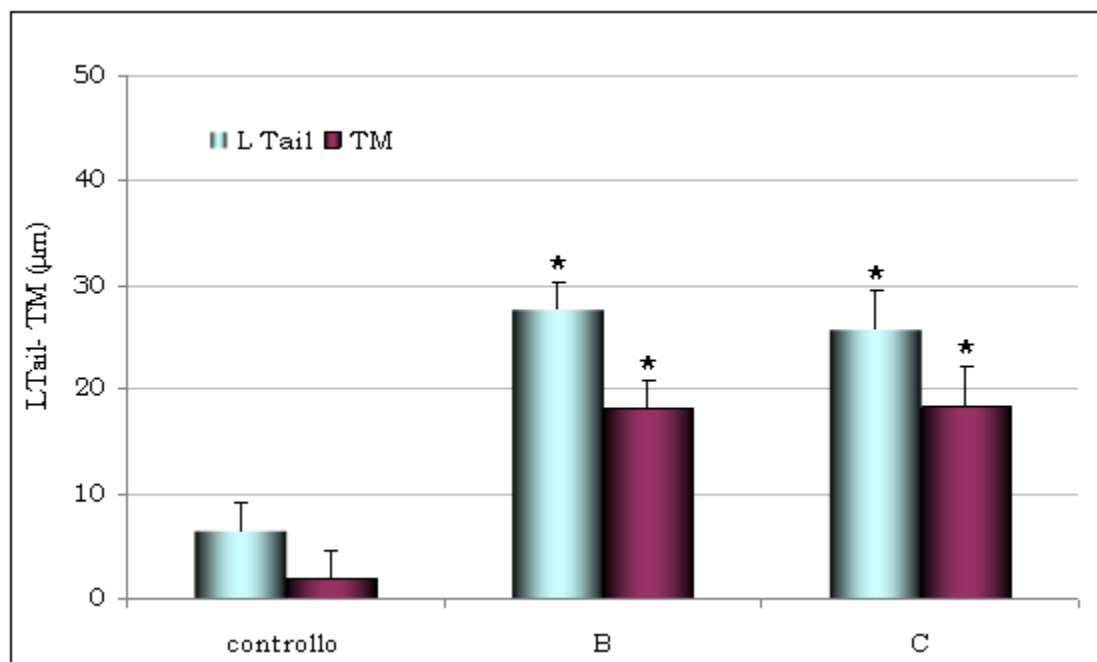


Figura 38. Valori L Tail e TM dopo trattamento di 1 h con tutti e quattro i terpeni alle concentrazioni alle acque B e C. I valori riportati sono ottenuti dalla misurazione di tre esperimenti indipendenti (medie \pm SD; * $p < 0,0001$ secondo Kruskal Wallis).

Mineralizzazione dei terpeni e dei reflui reali tramite fotocatalisi eterogenea

La fotocatalisi eterogenea è stata eseguita su soluzioni sintetiche dei quattro terpeni e su acque reflue reali campionate nelle industrie di trasformazione degli agrumi.

Al fine di valutare la degradazione dei terpeni, è stato prima verificato l'eventuale adsorbimento di questi sulla superficie del fotocatalizzatore, per cui prove preliminari sono state condotte al buio senza irradiazione in presenza solo del TiO_2 . Le prove sono state eseguite prelevando i terpeni in fase gassosa, presenti nello spazio di testa del reattore, e sono stati analizzati tramite gascromatografo Shimadzu GC-17 A. I risultati hanno indicato che la quantità di terpeni adsorbiti sulla superficie del TiO_2 è dipendente dalla concentrazione di questi in soluzione. A concentrazione di 8,4 mg/l di ciascun terpene, quantità tre ordini di grandezza maggiore delle concentrazioni di terpeni rilevate dall'analisi SPME-GC nelle acque reali, la

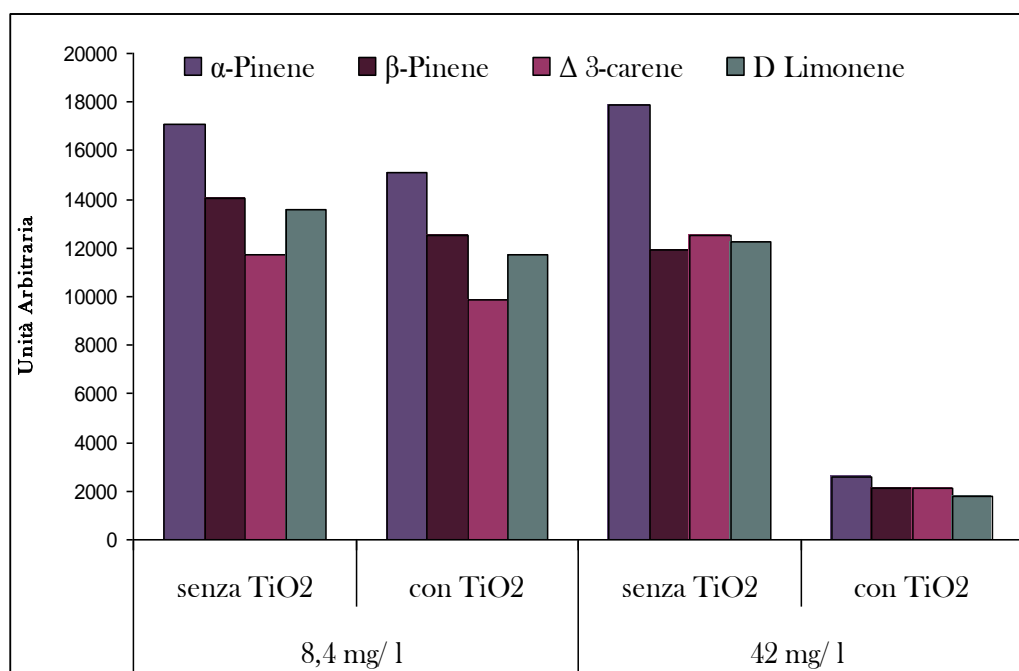


Figura 39. Foto-adsorbimento dei terpeni sulla superficie del TiO_2

quantità di terpene adsorbita dal TiO_2 è di circa il 10%. A concentrazione 5 volte più grande della prima, ovvero a 42 mg/l, l'adsorbimento da parte del fotocatalizzatore è per tutti i terpeni maggiore dell'80 %. Questo risultato può trovare spiegazione nella natura idrofobica dei terpeni, i quali in acqua ad alte concentrazioni possono aggregarsi tra di loro a formare micelle complesse e "circondare" la particella di TiO_2 . Sulla base di questo dato tutte le esperienze successive sono state condotte alla concentrazione più bassa di terpene, ovvero di 8,4 mg/l ($6,16 \times 10^{-5}$ M), poiché è ipotizzabile che gli stessi terpeni presenti in alte quantità potrebbero schermare e annullare la reazione di fotocatalisi. Inoltre, per quanto lontana dalle quantità reali che sono di tre ordini di grandezza minore, questa concentrazione risulta la quantità ideale per seguire il processo di degradazione.

Successivamente è stata osservata la reattività in prove effettuate alle stesse condizioni sperimentali utilizzate per gli esperimenti di fotoreattività, ma in assenza di catalizzatore, di O_2 o di luce. Si è concluso che la simultanea presenza di O_2 , di catalizzatore, e di irradiazione sono necessari per il verificarsi del processo di degradazione dei terpeni.

I risultati delle prove di fotocatalisi effettuate su soluzioni sintetiche dei terpeni sono mostrati in figura 40 (a-d) in cui sono riportate le concentrazioni di α -pinene, β -pinene, D-limonene e Δ^3 -carene e la quantità di CO_2 formate in funzione del tempo di irradiazione. Per tutti i casi il substrato è completamente scomparso dopo irradiazione in tempi che variano da 4,5 a 8 h, a seconda del terpene. La comparsa di CO_2 è stata osservata contemporaneamente alla scomparsa dei terpeni. La quantità di CO_2 prodotta nella fase gassosa è sempre stata inferiore alla quantità stechiometrica stimata dalla completa ossidazione del carbonio contenuto nel substrato di partenza. Tuttavia, la perdita di carbonio è dello stesso ordine di grandezza di

CO₂ nella soluzione reagente.

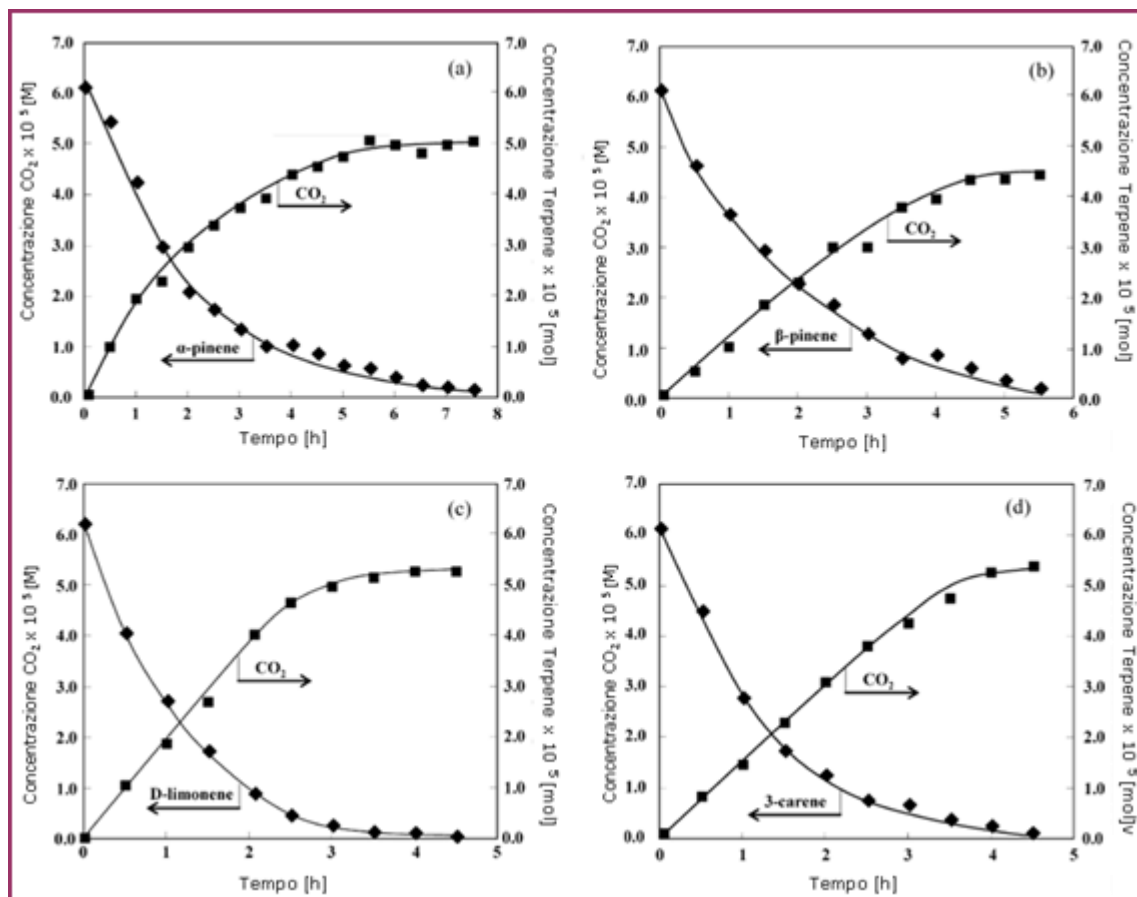


Figura 40. Concentrazioni di α -pinene, β -pinene, D-limonene e Δ^3 -carene e la quantità di CO₂ formate in funzione del tempo di irradiazione.

Questi dati indicano che i substrati sono stati completamente mineralizzati durante il processo di fotocatalisi.

Una prova è stata condotta con una soluzione contenente i quattro terpeni a una concentrazione complessiva di $2,47 \times 10^{-4}$ M corrispondente alla somma di quella utilizzata nelle prove effettuate con i singoli terpeni, ma è stata monitorata solo la foto-evoluzione di CO₂ (Fig. 41). Infatti lo scopo non era quello di studiare in dettaglio l'influenza reciproca dei terpeni sulla degradazione fotocatalitica, ma solo di verificare se la fotocatalisi poteva essere in linea di principio applicata alla miscela delle molecole studiate. I risultati hanno dimostrato che anche in tale circostanza la mineralizzazione è

stata completata dopo circa 10 h di irradiazione, ossia dopo un tempo più lungo rispetto a quello necessario per degradare i singoli terpeni.

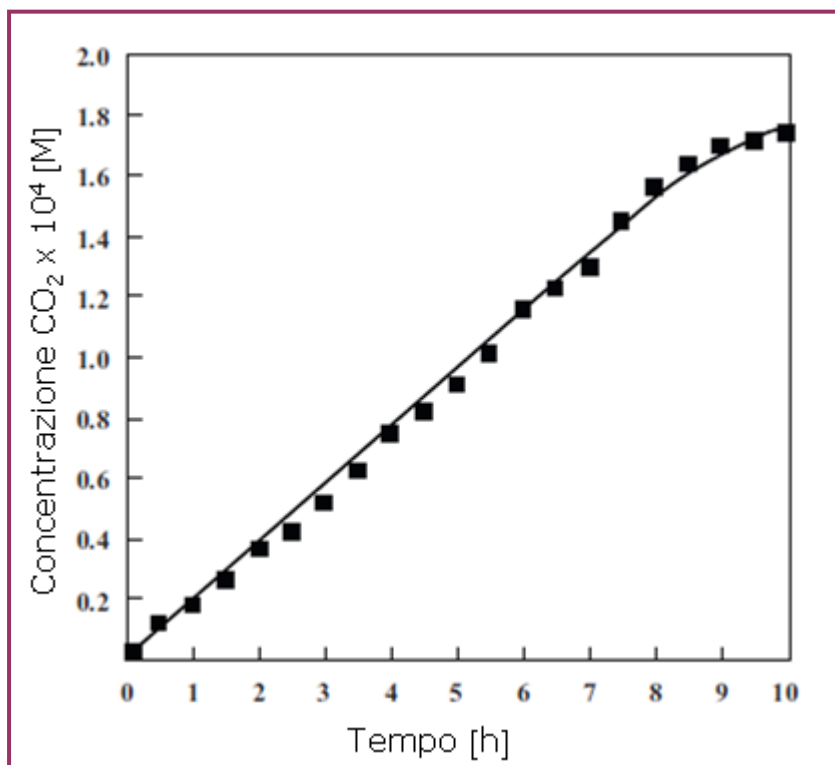


Figura 41. La quantità di CO₂ formata in funzione del tempo di irradiazione dall'irradiazione dei quattro terpeni a una concentrazione complessiva di $2,47 \times 10^{-4}$

La fotocatalisi è stata applicata anche per la degradazione degli inquinanti presenti nelle acque reflue reali. Le prove sono state condotte utilizzando le acque di scarico (B), campionate nel 2008 nell'azienda 1, e le acque di scarico delle aziende 1 e 2 nel 2010. Il processo di fotodegradazione è stato osservato tramite analisi al TOC misurando la quantità di carbonio organico nelle acque. Filtrando le acque con filtri da 20-45 μm , per evitare l'intasamento della siringa del TOC, le analisi parallele al gas cromatografo avevano evidenziato la quasi totale assenza dei terpeni in soluzione. Considerato che lo scopo è comprendere se la fotocatalisi eterogenea sia efficace non solo in soluzioni sintetiche dei quattro terpeni studiati ma anche su effluenti reali provenienti da industrie di trasformazione degli agrumi,

sono state condotte delle prove utilizzando campioni reali seguendo soltanto la scomparsa del carbonio organico totale (TOC).

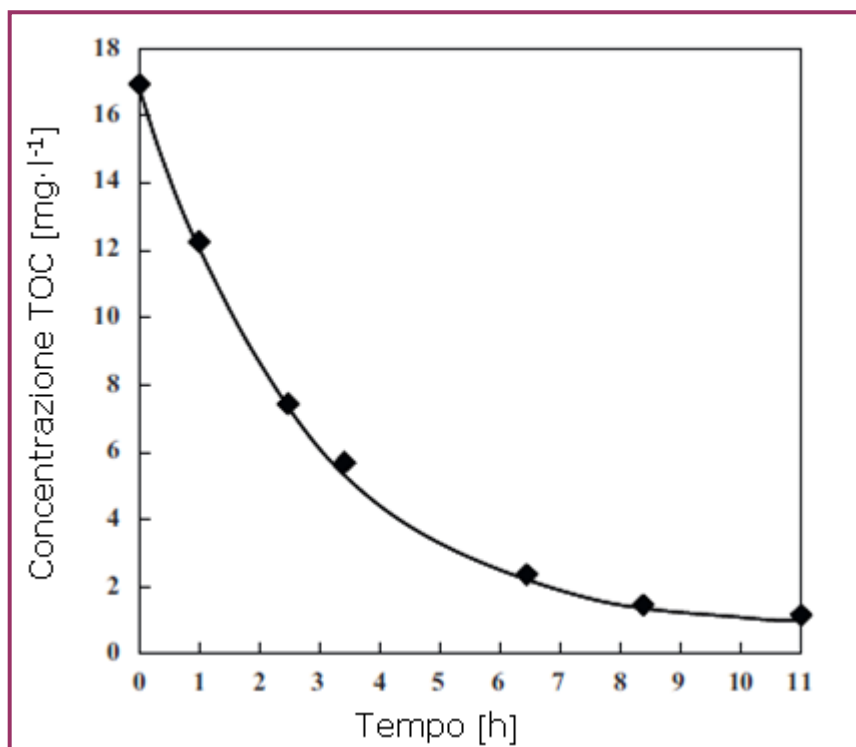


Figura 42. Concentrazione TOC in funzione del tempo di irradiazione del campione B dell'Azienda 1

Nella figura 42 è presente la concentrazione di carbonio organico totale (TOC) in funzione del tempo di irradiazione del campione B dell'azienda 1. La scomparsa dopo 11 h di carbonio organico ha indicato che anche in una situazione reale in cui sono presenti altre molecole la tecnologia fotocatalitica può essere applicata (Catanzaro et al 2010).

I sistemi di depurazione classici, con fanghi biologici attivi, possono essere abbastanza efficaci in alcuni casi, molto meno in altri. Le due aziende che sono state scelte casualmente hanno dei sistemi di depurazione delle acque reflue che danno risultati diversi. Come è possibile vedere in tabella XXI, su campionamenti del 2010, l'azienda 1 abbattere più del 50% il carico di sostanze organiche, mentre l'azienda 2 abbatte solo il 10% della portata

organica.

		TC mg/l (PPm)
Azienda 1	A	110,3
	B	326,3
	C	154,1
Azienda 2	A	101,5
	B	243,2
	C	218

Tab XXI. Concentrazioni TOC delle acque reflue.

Prove preliminari di fotocatalisi condotta sui campioni del 2010, provenienti da entrambe le aziende, hanno confermato l'efficacia di tale tecnologia.

Valutazione della genotossicità dei reflui reali

I reflui reali campionati nell'ultimo anno di ricerca (2010), sono stati saggiati col test di Ames e con il Comet Assay. Per entrambi i test sono state utilizzate le acque A, B e C delle aziende 1 e 2, opportunamente microfiltrate per eliminare la presenza di contaminazioni batteriche.

Test di Ames

Il test di Ames è stato eseguito con quantità crescenti di ciascun campione: 10, 20, 50 e 100 μ l senza attivazione metabolica. I risultati indicano che ciascun refluio dell'azienda 1 induce aumento della reversione genica al crescere delle dosi. In particolare, con 50 μ l del refluio B e con 100 μ l di ciascun refluio, il numero dei revertenti indotti diventa altamente significativo ($p < 0,0001$) rispetto al numero dei revertenti spontanei (Fig. 41).

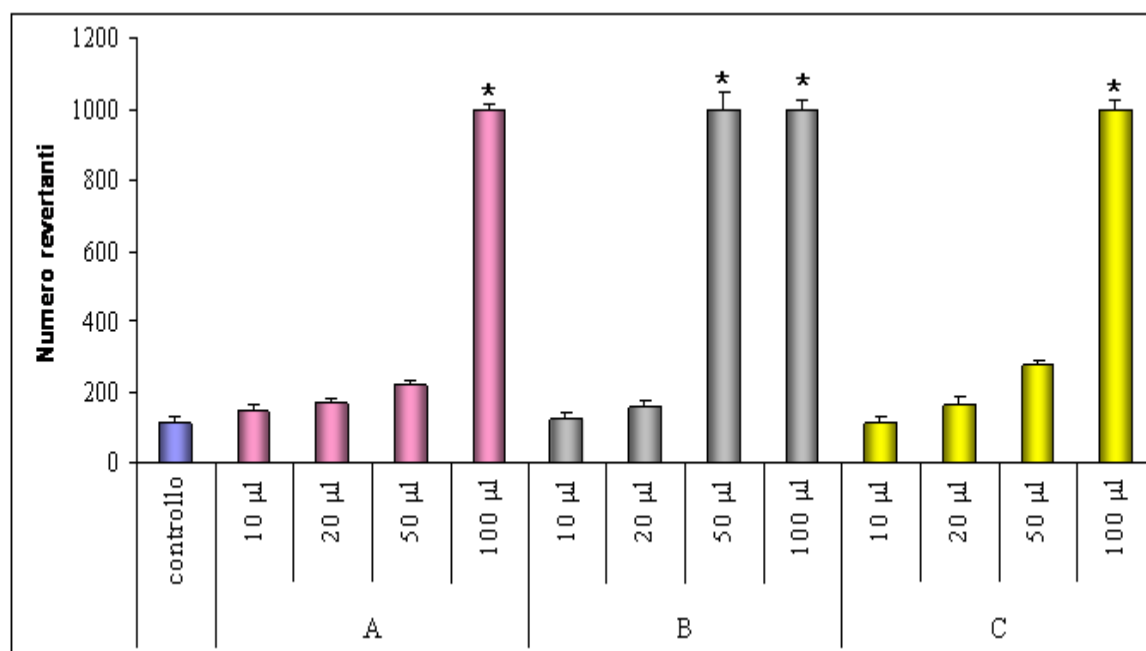


Figura 41. Test di Ames con reflui reali dell'Azienda 1. I dati rappresentano la media di tre prove indipendenti \pm SD; * $p < 0,0001$ secondo il t-Test)

Risultati analoghi sono stati ottenuti con le acque dell'Azienda 2, con la

particolarità che il numero dei revertenti indotti rispetto al controllo è altamente significativo quando sono stati utilizzati 50 µl delle acque prima della depurazione con sistemi biologici (B) e quando sono stati adoperati 50 µl delle acque dopo la depurazione (C) (Fig. 42).

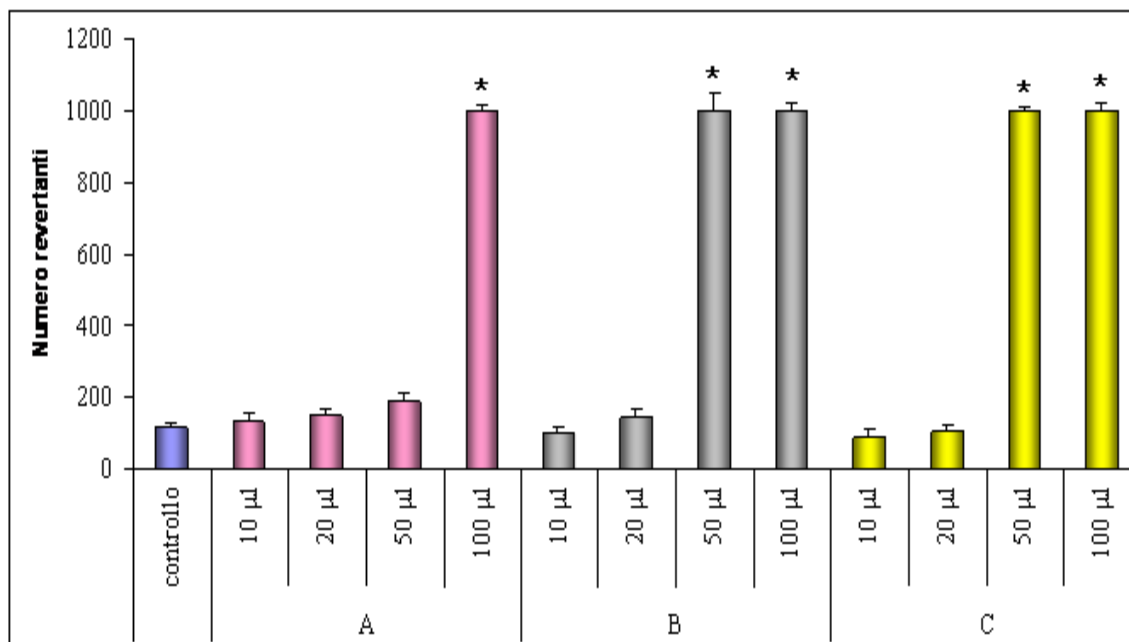


Figura 42. Test di Ames con reflui reali dell'Azienda 2. I dati rappresentano la media di tre prove indipendenti \pm SD; * $p < 0,0001$ secondo il t-Test.

Comet Assay

Le cellule V79 sono state trattate con 100 µl di acque A, B e C dell'azienda 1 e 2, per tempi di esposizione di 1h, 6 h e 24 h. Alla fine del trattamento, è stata valutata la vitalità cellulare con il trypan blu. I risultati hanno indicato che le acque reali microfiltrate sono utilizzabili per la valutazione della genotossicità mediante il test della cometa (Tab. XXII)

	Dose	% Vitalità cellulare		
	100µl/ml	1 h	6h	24h
Azienda 1	A	95,6±8,2	89±3,8	90±6,2
	B	96,8±6,7	92±4,2	89,5±5,5
	C	96,2±6,3	91±4,8	87,7±6,8
Azienda 2	A	90±5	86±4,3	90±6
	B	94±5,5	80±3,2	86±3,7
	C	90±4,8	81±3,6	89±6

Tabella XXII. Vitalità cellulare dopo trattamento per tempi diversi con aliquote delle acque reflue microfiltrate delle Aziende 1 e2.

I risultati dell'analisi qualitativa dei preparati ottenuti dopo 1h di trattamento, mostrati in figura 43, hanno rivelato che le acque B di entrambe le aziende sono le più genotossiche; infatti la percentuale totale di cellule danneggiate dal refluo B dell'Azienda 1 è del 57 % e del 70% dell'Azienda 2. Inoltre, la percentuale totale dei nuclei danneggiati dal refluo C dell'Azienda 1 si abbassa al 36 %, mentre rimane quasi invariato rispetto a B per l'Azienda 2 (61%), indicando un più efficace sistema di depurazione dell'Azienda 1. Un andamento analogo della genotossicità si osserva nei preparati di 6 e 24 h di trattamento accompagnato da un'aumentata percentuale di cellule danneggiate, che potrebbe essere dovuta all'intervento dei sistemi di riparazione del DNA.

Le analisi quantitative delle cellule esposte per 1h ai reflui reali delle due aziende mostrano che i valori di LTail e TM sono altamente significativi ($p < 0,001$) rispetto ai valori del non trattato, fatta eccezione per i valori di TM dei reflui C dell'Azienda 2 (Fig. 44).

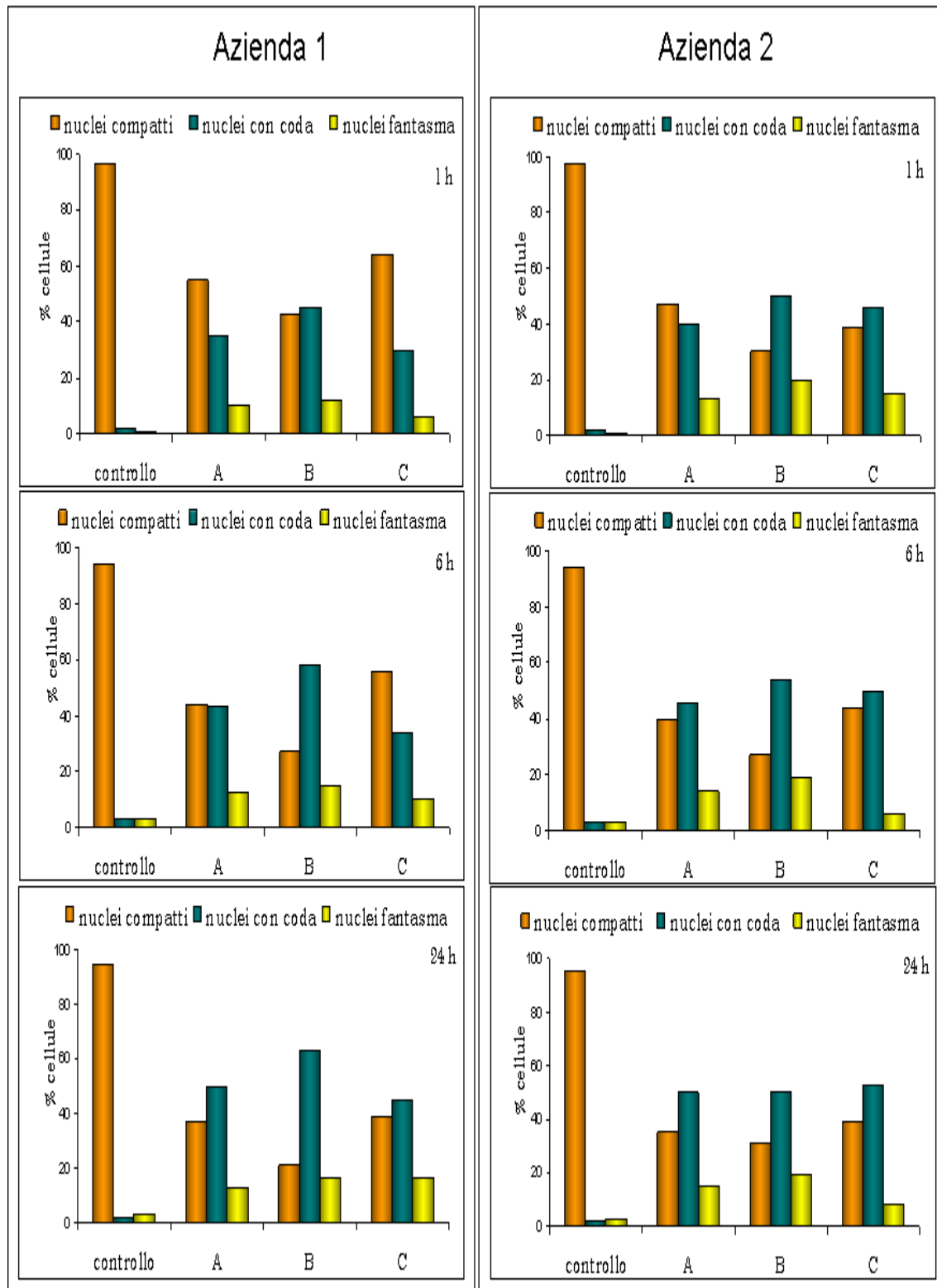


Figura 43. Risultati analisi quantitativa del comet assay dopo trattamento per tempi divisi con i reflui reali dell'Azienda 1 e 2.

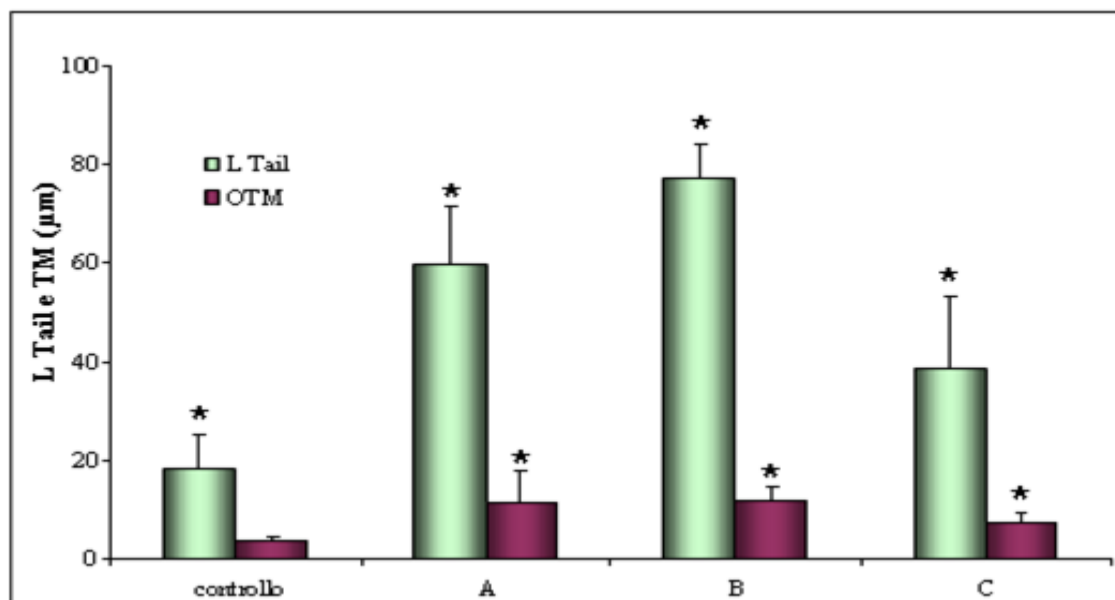


Figura 44. Valori di L Tail e TM dopo trattamento con reflui reali dell'Azienda 1. Valori medi di tre prove indipendenti \pm SD; * $p < 0,0001$ secondo Skruskal Wallis

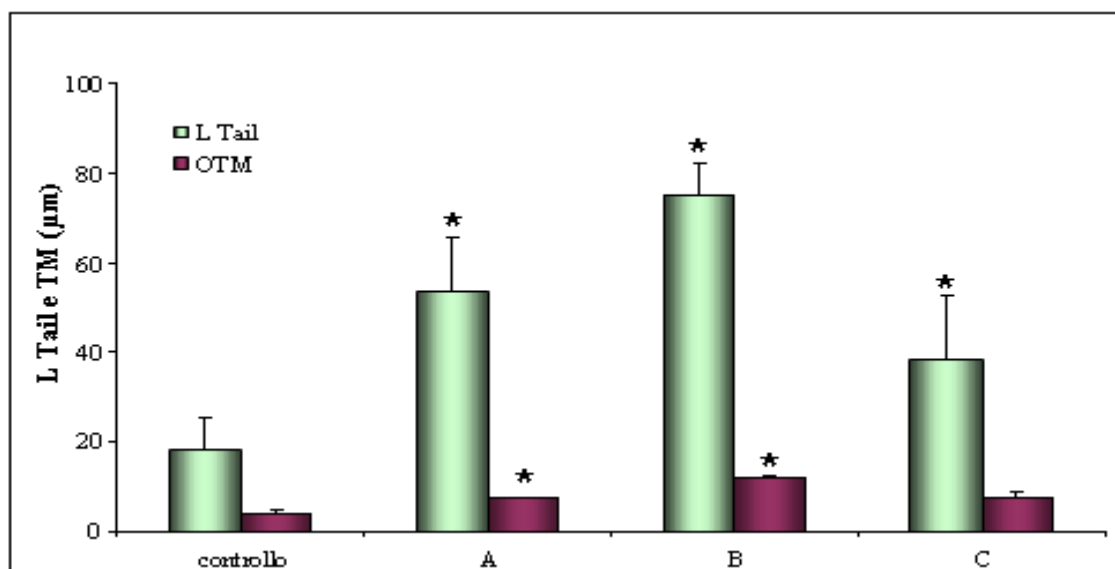


Figura 45. Valori di L Tail e TM dopo trattamento con reflui reali dell'Azienda 2. Valori medi di tre prove indipendenti \pm SD; * $p < 0,0001$ secondo Skruskal Wallis

Complessivamente i risultati dei test di mutagenesi sono molto interessanti e meritano alcune considerazioni. Innanzitutto, risulta evidente che i reflui sono genotossici in entrambi i sistemi cellulari impiegati e che inducono mutazione genica in assenza di attivazione metabolica (vedi test di Ames).

Sono in corso indagini al fine di poter identificare le sostanze responsabili degli effetti genotossici e, poichè l'analisi HS-SPME-GC, alla quale sono stati sottoposti i reflui filtrati ha rivelato che α -pinene, β -pinene, D-limonene e Δ^3 carene sono al di sotto dei Limiti di Determinazione (Fig. 46), ritengo di poter escludere che tale effetto sia causato dai quattro terpeni. In particolare, ritengo che sia importante concentrare l'attenzione sui reflui in uscita, i quali, sebbene biologicamente depurati, sono risultati genotossici.

Ciò lascia sospettare che con il sistema di depurazione aziendale, certamente efficace nell'abbattere i terpeni, vengono immessi nell'ambiente potenzialmente pericolosi.

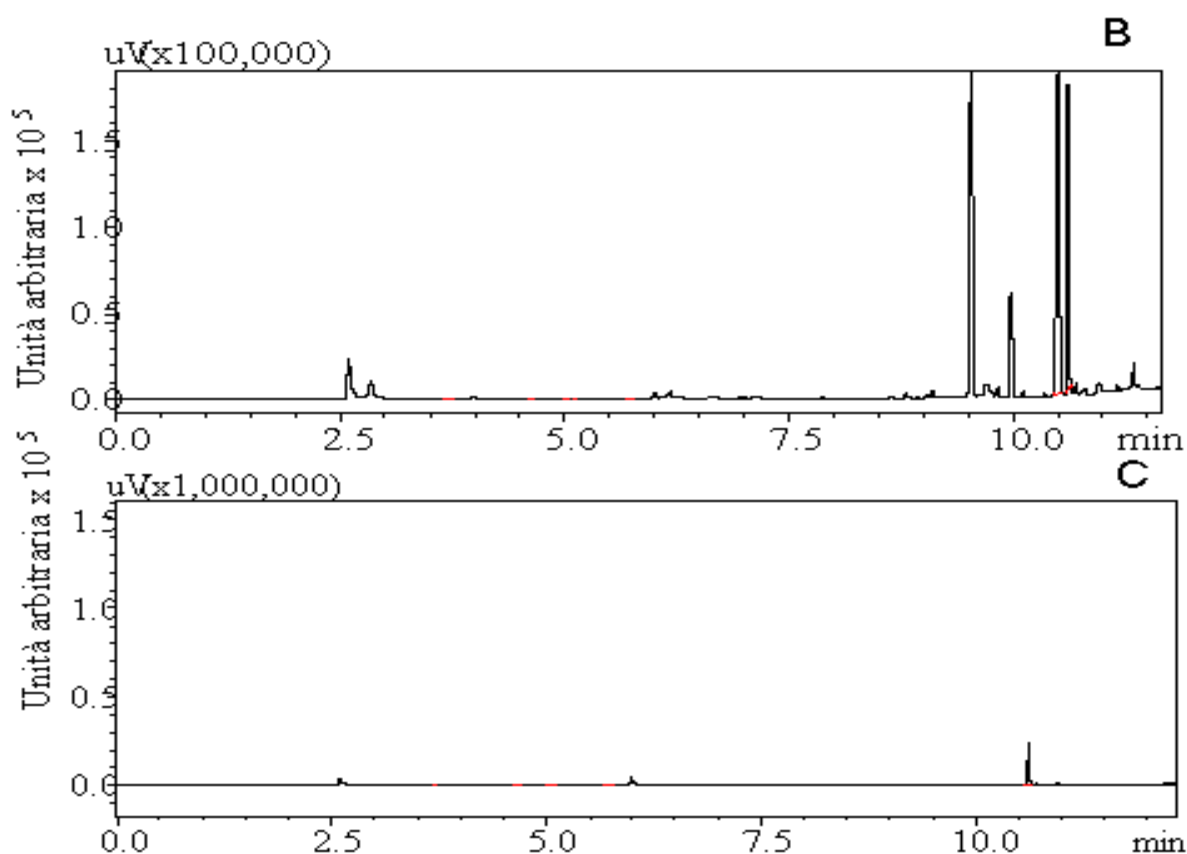


Figura 46. Cromatogrammi acquemircofiltrate B e C dell'Azienda I.

Un dato interessante, assolutamente preliminare, è stato ottenuto dalla degradazione fotocatalitica del refluo filtrato C dell'Azienda 1. A intervalli di tempo durante il processo di fotocatalisi, aliquote (100 µl) sono state prelevate e testate con il test di Ames. Tale protocollo ha consentito di rivelare che il campione prelevato dopo 5 h di fotocatalisi ha perso la capacità di indurre aumento dei revertenti.

Conclusioni

Le prospettive di competitività e di sviluppo delle industrie di trasformazione agrumaria sono condizionate dalla possibilità di disporre di sistemi di depurazione delle acque reflue, sostenibili dal punto di vista economico ed ambientale.

Le acque reflue agrumarie sono essenzialmente costituite dalle acque di lavaggio dei frutti, degli impianti, delle attrezzature, nonché dalle acque prodotte dalle linee di estrazione degli oli essenziali e di essiccazione delle scorze. Il carico organico prodotto è sempre molto elevato.

Gli effluenti agrumari sono comunemente trattati in impianti di depurazione biologica convenzionale, in special modo del tipo a fanghi attivi; tali impianti non sono generalmente in grado di assicurare affidabilità depurativa, in quanto richiedono una costante sedimentabilità del fango di ricircolo, che viene frequentemente compromessa dalla presenza di oli essenziali, dalla carenza di ossigeno disciolto e di nutrienti.

In questo lavoro si è voluto focalizzare l'attenzione sulle componenti principali di queste acquei terpeni. A tale scopo sono state monitorate le acque di due aziende durante tre campagne di trasformazione degli agrumi. Ciò che si è dedotto dalle analisi dei reflui è che, sicuramente nel periodo di massima attività produttiva delle aziende, i sistemi di depurazione sono meno efficienti rispetto ai bassi o medi periodi di attività lavorativa. Il processo di depurazione, nelle linee generali, è risultato efficace nell'abbattimento dei monoterpeni presi in esame. Ma poiché tracce di terpeni persistono nelle acque che vengono riversate nell'ambiente, si è voluto studiare i possibili effetti genotossici

tramite applicazione di test di mutagenesi che hanno rivelato alcuni punti interessanti:

- ❖ i singoli quattro terpeni esaminati, non hanno effetti genotossici;
- ❖ la presenza contemporanea dei terpeni all'interno della cellula, sia procariotica che eucariotica induce cambiamenti a livello della molecola del DNA. Tali modifiche sembrano il risultato di un effetto sinergistico nell'induzione di mutazione geneica; sarebbe interessante, in seguito, verificare se combinazioni diverse dei quattro terpeni danno lo stesso effetto. Ciò potrebbe servire ad identificare il meccanismo d'azione dei componenti di questa miscela semplice

Inoltre, è stato dimostrato che:

- ❖ il refluo privo dei quattro terpeni è genotossico. Ritengo che sia fondamentale procedere all'identificazione del componente/i responsabile/i di tali effetti;
- ❖ la fotocatalisi eterogenea è un sistema valido sia per la mineralizzazione della miscela sintetica dei terpeni che del refluo reale e potrebbe quindi essere applicato su larga scala nelle industrie di trasformazione degli agrumi;
- ❖ durante la fotocatalisi eterogenea il refluo perde le capacità genotossiche.

Molto lavoro rimane ancora da fare. Infatti secondo il modello generale per l'identificazione del rischio delle miscele (EPA, 2000), i risultati possono rientrare nella prima fase, quella dell'identificazione del pericolo

Bibliografia

1. Ahmed S., Rasul M.G., Brown R. Hashib M.A.: *"Influence of parameters on the heterogeneous photocatalytic degradation of pesticides and phenolic contaminants in wastewater"*. Journal of Environmental Management, 2010: 1 e 20.
2. Ahmed S., Rasul M.G., Brown R., Hashib M.A.: *"Influence of parameters on the heterogeneous photocatalytic degradation of pesticides and phenolic contaminants in wastewater: a short review"*. 2011, J Environ Manage., 92, 3: 311-330.
3. Augusto F., Valente A.L., dos Santos Tada E., Rivellino S.R.: *"Screening of Brazilian fruit aromas using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry"*. 2000, J. Chromatogr A 873, 1: 117-127.
4. Auerbach C., Robson J.M., Carr J.G., *"The Chemical Production of Mutations"*. 1947, Science, 105, 2723: 243-247.
5. Auerbach C., Robson J.M.: *"The production of mutations by chemical substances"*. 1947, Proc R Soc Edinb Biol., 62: 271-283.
6. Auerbach C.: *"Biological hazards of nuclear and other radiations"*. 1956, Nature, 178, 4531:453.
7. Augugliaro V., Cavallero L., Marcì G., Palmisano L., Pramauro E.: *"Influence of operational variables on the photodegradation kinetics of Monuron in aqueous titanium dioxide dispersions"*. 1994, Stud. Surf. Sci. Catal. 82: 713–720.
8. Augugliaro V., Loddo V., Marcì G., Palmisano L., Schiavello M., Sclafani A.: 1997 *"La Chimica e L'industria"*.
9. Bahnemann W., Muneer M., Haque M.M.: *"Titanium dioxide-mediated photocatalysed degradation of few selected organic pollutants in aqueous suspensions"*. 2007, Catalysis Today, 124, 3-4: 133-148.
10. Bakkalia F., Averbeck S., Averbeck D., Zhiri A., Idaomar M.: *"Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast Saccharomyces cerevisiae."* 2005, Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 585, 1-2: 1-13.
11. Bakker J.: *"Flavor interactions with the food matrix and their effects on perception"*. 1995, In: Gaonkar A.G. (Ed.), Ingredient Interactions. Effects on Food Quality. Marcel Dekker: 411–439.
12. Bard A. J.: *"Photochem"* 1980, Science, 207, 4427: 139-144.
13. Bickley R. I., Gonzalez-Carreno T., Lees J.S., Palmisano L., Tilley R.J.D: 1991, J. Sol. State Chem., 92: 178.
14. Boudart M.: *"Turnover Rates in Heterogeneous"* 1995, Journal: Chem Revs Book Title: Catalysis Author, 95: 661

15. Buhagiar J.A., Podesta M.T., Wilon A.P., Micallef M., Ali S.: "*The induction of apoptosis in Human melanoma, breast and ovarian cancer cell lines using an essential oil extract from the conifer Tetraclinis articulata*". 1999, *Anticancer Res.*, 19, 6B: 5435-5443.
16. Bylaite E., Meyer A.: "*Characterisation of volatile aroma compounds of orange juices by three dynamic and static headspace gas chromatography techniques*". 2006, *Eur Food Res Technol*, 222: 176–184.
17. Carey JH, Lawrence J, Tosine HM, "Photodechlorination of PCB's in the presence of titanium dioxide in aqueous suspensions". 1976, *Bull Environ Contam Toxicol.*, 16, 6: 697-701.
18. Carnesecchi S., Schneider Y., Ceraline J., Duranton B., Gosse F., Seiler N., Raul F.: "*Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells*". 2001, *J Pharmacol Exp Ther.* 298, 1: 197-200.
19. Carrier M., Perol N., Herrmann J.M., Bordes C., Horikoshi S., Paisse J.O., Baudot R., Guillard C.: "*Kinetics and reactional pathway of Imazapyr photocatalytic degradation Influence of pH and metallic ions*". 2006, *Applied Catalysis B Environmental*, 65, 1-2: 11-20.
20. Casciano D.A., Aidoo A., Chen T., Mittelstaedt R.A., Manjanatha M.G., Heflich R.H.: "Hprt mutant frequency and molecular analysis of hprt mutations in rats treated with mutagenic carcinogens". 1999, *Mutat Res*, 431, 2: 389-395.
21. Catanzaro I., Avellone G., Marcì G., Saverini M., Scalici L., Sciandrello G., Palmisano L.: "*Biological effects and photodegradation by TiO₂ of terpenes present in industrial wastewater*". 2011, *J Hazard Mater.*, 185, 2, 3: 591-597.
22. Chen J.Q., Hu Z.-J., Wang D., Gao C.J., Rong J.: "*Photocatalytic mineralization of dimethoate in aqueous solutions using TiO₂: Parameters and by-products analysis*". 2010, *Desalination.*, 258, 1-3: 28-33.
23. Clarke S.: "*Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues*". 1992, *Annu. Rev. Biochem.*, 61: 355–386.
24. Crowell P.L., Lin S., Vedejs E., Gould M.N.: "*Identification of metabolites of the antitumor agent d-limonene capable of inhibiting protein iso-prenylation and cell growth*". 1992, *Cancer Chemother Pharmacol.* 31, 3: 205-212.
25. de Angelis F., Di Tullio A., Mellerio G., Quaresima R., Volpe R.: "*Investigation by solid-phase micro-extraction and gas chromatography mass spectrometry of organic films on stone monuments*". 1999, *Rap. Commun. Mass Spectrom.* 13: 895

26. de Bruyn C.H.: "*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase deficiency*". 1976, Hum Genet, 31, 2: 127-150.
27. De la Calle G.D., Magnaghi S., Reichenbacher M., Danzer K.: "*Systematic optimization of the analysis of wine bouquet components by solid-phase microextraction*". 1996, J. High Resolut Chromatogr., 19: 257.
28. Di Pasqua R.: "*In Vitro antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean Apiaceae, Verbenaceae and Lamiaceae against pathogens and spoilage bacteria*". 2005, Ann. Microbiol., 55: 139-143.
29. Dohsha S., Takeuchi M., Anpo M.: "*Photoinduced superhydrophilic properties of Ti-B binary oxide thin films and their photocatalytic reactivity for the decomposition of NO*". 2001, I Nanosci Nanotechnol., 1, 3: 337-342.
30. Druaux C., Le Tha M., Seuvre A.M., Voilley A.: "*Application of headspace analysis to the study of aroma compounds-lipids interactions*". 1998, J. Am. Oil Chem. Soc., 22, 2: 127-128.
31. Evgenidou E., Fytianos K., Poulios I.: "*Photocatalytic oxidation of dimethoate in aqueous solution*". 2005, Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry 175, 1: 29-38.
32. Fall R., Karl T., Hansel A., Jordan A., Lindinger W.: "*Volatile organic compounds emitted after leaf wounding: On-line analysis by proton-transfer-reaction mass spectrometry*". 1999, Journal of Geophysical Research, 104, 13: 15.963-15.974.
33. Flamini G., Tebano M., Cioni P.L.: "*Volatiles emission patterns of different plant organs and pollen of Citrus limon*". 2007, Analytica Chimica Acta, 589, 1: 120-124.
34. Garten S., Falkner R.V.: "*Role of mentholated cigarettes in increased nicotine dependence and greater risk of tobacco-attributable disease*". 2004, Prev Med., 38, 6: 793-798.
35. Gee P., Maron D.M., Ames B.N.: "*Detection and classification of mutagens: a set of base-specific Salmonella tester strains*". 1994, Proc Natl Acad Sci U S A., 91, 24: 11606-11610.
36. Georgescu, Roegen N.: "*Lo stato stazionario e la salvezza ecologica: un'analisi termodinamica*". 1984, Ed. in "Economia e ambiente, 1: 15.
37. Giupponi C.: "*Environmental evaluation of alternative cropping systems with impact indices of pollution*". 1998, European Journal of Agronomy, 8: 71-82.
38. Guichard E.: "*Flavour retention and release from protein solutions*". 2006, Biotechnol Adv. 24, 2: 226-229.
39. Hamm S., Lesellier E., Bleton J., Tchapla A.: "*Optimization of headspace solid phase microextraction for gas chromatography/mass*

- spectrometry analysis of widely different volatility and polarity terpenoids in olibanum*". 2003, J. Chromatography A, 1018, 1: 73-83.
40. Harborne, J.B.: *"Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis"*. 1998, third ed. Chapman and Hall, London.
 41. Kaneco S., Itoh K., Katsumata H., Suzuki T., Ohta K.: *"Titanium dioxided-mediated solar photocatalytic degradation of thiram in aqueous solution: kinetics and mineralization"*. 2009, Chemical Engineering Journal, 148: 50-56.
 42. Karoui I.J., Wannes W.A., Marzouk B. *"Refined corn oil aromatization by Citrus aurantium peel essential oil"* 2010, Industrial Crops and Products 32: 202–207.
 43. Karren D.B., Peter G.W., Paul I.F., Dion R.T., David N.: *"La Chemical composition and cytotoxicity of oils and eremophilanes derived from various parts of Eremophila mitchellii"* Benth. Myoporaceae.
 44. Kato K., Cox A.D., Hisaka M.M., Graham S.M., Buss J.E., Der C.J.: *"Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity"*. 1992, Proc Natl Acad Sci U.S.A., 89, 14: 6403–6407.
 45. Kocbek P., Teskac K., Kreft M.E., Kristl J.: *"Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO₂ nanoparticles"*. 2010, Small, 6, 17: 1908–1917.
 46. Kong Z., Liu Z., Ding B.: *"Study on the antimutagenic effect of pine needle extract"*. 1995, Mutat Res., 347, 3-4: 101-104.
 47. Lazutka J.R., Mierauskiene J., Slapšyte G., Dedonyte V.: *"Genotoxicity of dill (Anethum graveolens L.), peppermint (Mentha piperita L.) and pine (Pinus sylvestris L.) essential oils in human lymphocytes and Drosophila melanogaster"*. 2001, Food Chem Toxicol, 39, 5: 485-492.
 48. Le Thanh M., Thibeaudeau P., Thibaut A., Voilley A.: *"Interactions between volatile and non-volatile compounds in the presence of water"*. 1992, Food Chem., 43: 129–135.
 49. Lee C.H., Sung B.K., Lee H.S.: *"Acaricidal activity of fennel seed oils and their main components against Tyrophagus putrescentiae, a stored-food mite"*. 2006, Journal of Stored Products Research, 42, 1: 8-14.
 50. Li Puma G., Bono A., Krishnaiah D., Collin J.G.: *"Preparation of titanium dioxide photocatalyst loaded onto activated carbon support using chemical vapour deposition: a review paper"*. 2008, J. Hazard Mater, 157, 2-3: 209-219.
 51. Little J.B., Gorgojo L., Vetrovs H.: *"Delayed appearance of lethal and specific gene mutations in irradiated mammalian cells"*. 1990, Int J Radiat Oncol Biol Phys., 19, 6: 1425-1429.
 52. Lohman F.Z.: 1967, Naturforsch. Teil A., 22: 843

-
53. Lorenzini G., Nali C.: *"Le piante e l'inquinamento dell'aria"*. 2005, Springer-Verlag.
54. Mahmoodi N.M., Arami M.: *"Degradation and toxicity reduction of textile wastewater using immobilized titania nanophotocatalysis"*. 2009, J Photochem Photobiol B., 94, 1: 20-24.
55. Manura J. J.: Overton S. *"Comparison of Sensitivity Of Headspace GC, Purge and Trap Thermal Desorption and Direct Thermal Extraction Techniques For Volatile Organics"*. 1999, Scientific Instrument Services.
56. Mark H.F., Naram R., Singer J.T., Rice R.W., Bastan B., Beauregard L.J., LaMarche P.H.: *"Cytotoxicity and genotoxicity of wood drying condensate from Southern Yellow Pine: an in vitro study"*. 1995, Mutat Res., 342, 3-4: 191-196.
57. Mark H.F., Naram R., Singer J.T., Rice R.W., Bastan W.C., Beauregard L. J., Lamarche P.H.: *"Wood-drying condensate from Eastern white pine induced cytotoxicity and genotoxicity in vitro"*. 1996, Ann Clin Lab Sci, 26, 1: 64-70.
58. Miller M. E., Stuart J. D.: *"Comparison of Gas-Sampled and SPME-Sampled Static Headspace for the Determination of Volatile Flavor Components"*. 1999, Anal. Chem., 71, 1: 23-27.
59. Mohseni D., Grant A.: *"Biofiltration of mixtures of hydrophilic and hydrophobic volatile organic compounds"*. 2000, Chemical Engineering Science, 55: 1545-1558.
60. Mohseni M., Allen D.G.: *"Biofiltration of mixtures of volatile organic compounds emitted from pulp and paper industries"*. 1998, International Environmental Conference & Exhibit: 183-189.
61. Møller P., Knudsen L.E., Loft S., Wallin H.: *"The Comet Assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect confounding factors"*. 2000, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., 9, 10: 1005-1010.
62. Muller H. J.: *"Resume and Perspectives of the Symposium on genes and chromosomes"* 1941, Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 9: 290-308.
63. Ollis D.F.: *"Photocatalytic Purification and treatment of Water and Air"*. 1993 (Editori) Al-Ekabi.
64. Pawliszyn, J.B.; Alexandrou, N.: *"Indirect supercritical fluid extraction of organics from water matrix samples"*. 1989, Water Pollution Research Journal of Canada, 24, 2: 207-214.
65. Pourata R., Khataee A.R., Aber S., Daneshvar N.: *"Removal of the herbicide Bentazon from contaminated water in the presence of synthesized nanocrystalline TiO₂ powders under irradiation of UV-C light"*. 2009, Desalination 249, 301 e 307.

66. Public law 94-469, 94th Congress: "*An act to regulate commerce and protect health and environment by requiring testing and necessary use restriction on certain substances, and for other purposes*". Oct 11. 1976.
67. Pyun M.S., Shin S.: "*Antifungal effects of the volatile oils from Allium plants against Trichophyton species and synergism of the oils with ketoconazole*". 2006, Phytomedicine, 13, 6: 394-400.
68. Roitman J. N, Merrill G.B., Beck J.J.: "*Survey of ex situ fruit and leaf volatiles from several Pistacia cultivars*" grown in California. 2010 wileyonlinelibrary.com- DOI 10.1002/jsfa.4268.
69. Rosenberg C., Tulla Liukkenenem, "Monoterpene and wood dust exposure: work-related symptoms among Finnish Sawmill workers" 2002, American Journal of Industrial Medicine 41: 38-53.
70. Rudiger H.W., Marquardt H., Schafer S.G., McClellan R., Welsch F.: "*Biomonitoring in Occupational Medicine*". 1999, Toxicology: 1927-1036,
71. Scalisi A., Palmisano L., Schiavello M.: 1990, J Phys. Chem., 94, 829.
72. Schaefer B., Hennig P., Engewald W.: "*Analysis of monoterpenes from conifer needles using solid phase microextraction*". 1995, J. High Resolut. Chromatogr 18: 587
73. Schiavello M. "*Heterogeneous Photocatalysis.*" 1995, John Wiley & Sons, New York.
74. Sciandrello G., Caradonna F., Barbata G.: "*Karyotype abnormalities in variant Chinese hamster cell line resistant to methyl methanesulphonate*". 1996, Hereditas , 124: 29-46.
75. Selli S., Cabaroglu T., Canbas A.: "*Volatile flavour components of orange juice obtained from the cv. Kozan of Turkey*". 2003, Journal of Food Composition and Analysis, 17: 789-796.
76. Seuvre A.M., Phillipe E., Rochard S., Voilley A.: "*Retention of aroma compounds in food matrices of similar rheological behaviour and different compositions*". 2006, Food Chem., 96: 104-114.
77. Shoff S.M., Grummer M., Yatvin M.B., Elson C.E.: "*Concentration-dependent increase of murine P388 and B16 population doubling time by the acyclic monoterpene geraniol*". 1991, Cancer Res, 51, 1: 37-42.
78. Sidney S., Tekawa I.S., Friedman G.D., Sadler M.C., Tashkin D.P.: "*Mentholated cigarette use and lung cancer*". 1995, Arch Intern Med. 155, 7: 727-732.
79. Silva A.G., Almeida D.L., Ronchi S.N., Bento A.C., Scherer R., Ramos A.C., Cruz Z.M.: "*The essential oil of Brazilian pepper, Schinus terebinthifolia Raddi in larval control of Stegomyia aegypti (Linnaeus, 1762)*". 2010, Parasit Vectors, 3: 79.
80. Singer J.T., Jackson J.A.; Rice R.W.: Microbiological methods for the detection of mutagens and cytotoxic components in wood drying

- condensates from Douglas fir, red oak, southern yellow pine, yellow poplar and eastern white pine” 1995, *Journal of Microbiological Methods* 22, 3: 229-242.
81. Song H.S., Sawamura M., Ito K., Kawaskimo K., Ukeda H.: “*Chemical compositions of the volatile part of yuzu (Citrus junos Tanaka) peel cold-pressed oils from Japan and Korea*”. 2000, *Flavour Fragrance J.* 15: 245.
82. Steven C.M., Mylorie A., Auerbach C., Moser H., Kirk I., Jensen K.A., Westergaard M.: “*Biological action of 'mustard gas' compounds*”. 1950, *Nature*, 166, 4233: 1019-1021.
83. Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F.: “*Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing*”. 2000, *Environ Mol Mutagen.*, 35, 3: 206-221.
84. Van Ruth, S.M., Frasnelli, J., Carbonell, L.: “*Volatile flavour retention in food technology and during consumption: juice and custard examples*”. 2008, *Food Chem.*, 106, 1385-1392.
85. Vas G., Vékey K.: “*Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis*”. 2004, *J Mass Spectrom*, 39, 3: 233-254.
86. Vichi S., Guadayol J.M., Caixach J., López-Tamames E., Buxaderas S.: “*Monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons of virgin olive oil by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry*”. 2006, *J Chromatogr A*, 1125, 1: 117-123.
87. Wei Q., Harada K., Ohmori S., Minamoto K., Wei C., Ueda A.: “*Toxicity study of the volatile constituents of Myoga utilizing acute dermal irritation assays and the Guinea-pig Maximization test*”. 2006, *J Occup Health.*, 48, 6: 480-486.
88. Y. Zhang, A. Weidenkaff, A. Reller, *Mat. Lett.*, 2002, 54: 375.
89. Yin H., Casey P.S., McCall M.J., Fenech M.: “*Effects of surface chemistry on cytotoxicity, genotoxicity, and the generation of reactive oxygen species induced by ZnO nanoparticles*”. 2010, *Langmuir*, 26, 19: 15399-15408.
90. Yu S.G., Hildebrandt L.A., Elson C.E.: “*Geraniol, an inhibitor of mevalonate biosynthesis, suppresses the growth of hepatomas and melanomas transplanted to rats and mice*”. 1995, *J Nutr.*, 125, 11: 2763-2767.

Attività svolta durante il periodo di dottorato

PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE:

- ❖ Sciandrello G, Mauro M, Caradonna F, Catanzaro I, Saverini M, Barbata G. "Acrylamide catalytically inhibits topoisomerase II in V79 cells". *Toxicol In Vitro*. (allegato)
- ❖ Catanzaro I, G. Avellone, G. Marcì, L. Palmisano, M. Saverini, L. Scalisi, G. Sciandrello "Biological effects and photodegradation by TiO₂ of terpenes present in industrial wastewater" inviato a *Journal of Hazardous Materials*- Elsevier. (allegato)

(PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE SOTTOPOSTE A REVISIONE

- ❖ _Sciandrello G., Mauro M., Catanzaro I., Saverini M., Caradonna F. and Barbata G., "Longlasting genomic instability following arsenite exposure in mammalian cells: the role of reactive oxygen species" inviato a *Environmental and Molecular Mutagenesis*
- ❖ " Barbata G., Caradonna F., Catanzaro I., Saverini M., Sciandrello G. "Genomic instability induced by α - pinene in Chinese Hamster cell line " inviato a Elsevier *System for Toxicology in Vitro*. (allegato)

PARTECIPAZIONI A CONGRESSI SCIENTIFICI

- SIBBM 2010 . "Frontiers in molecular Biology". Padova 3-5 June
I. Catanzaro, F. Naselli, A. Giacalone, G. Montalto, L. Marasà, M. Saverini, G. Sciandrello, F. Caradonna. "*CYP2E1 VNTR polymorphisms and hepatocarcinoma: a gender-specific correlation*"
- Excerpts from DBCS" VII Congresso Nazionale del Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo 17-18 December 2009
G. Barbata, F. Caradonna, I. Catanzaro, M. Saverini and G. Sciandrello: "*Biological effects of α -pinene in cultured mammalian cells*"
- 10 th ICEM, 2009-Firenze
M. Mauro, M. Saverini, I. Catanzaro, J. Leszczynska, G. Barbata, F. Caradonna, G. Sciandrello, Catherine B. Klein: "*Persistent dysregulation of DNA methylation in cell with arsenic-induced genomic instability*".
- Congresso annuale del Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo "A. Monroy" 18-19 Dicembre 2008

G. Barbata., F. Caradonna., I. Catanzaro, M. Mauro., M. Saverini., G. Sciandrello “*Arsenite-induced aneuploidy following short and long-term exposure in mammalian cells*”

- SPEA5 4-8 October 2008 Palermo
I.Catanzaro, L. Ceraulo, G. Marcì, L. Palmisano, M. Saverini , L. Scalici, G. Sciandrello
“*Evaluation Of Biological Effects And Heterogeneous Photodegradation Of Terpenes Present In Wastewater From A Citrus Fruit Transformation Factory*”.9° Congresso Nazionale SIGU (Società Italiana Genetica Umana) 23-25 Genova November 2008
- Bray F., Botta R., Catanzaro I., Mauro M., Saverini M., Barbata G., Sciandrello G., Caradonna F. “*Polimorfismi dei geni CYP2A6 e CYP2E1 in relazione a stili di vita in una popolazione della sicilia centro-occidentale*”
- Congresso annuale del Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo “A. Monroy” 20-21 December 2007G. Barbata., F. Caradonna., I. Catanzaro., M. Mauro., M. Saverini., G. Sciandrello. “*Genetic polymorphism of the bitter taste TAS2R38 gene in central Sicily*”